

Aus dem Veterinär-Pharmakologischen Institut (Prof. Dr. H. Graf)
und dem Veterinär-Chemischen Laboratorium (Prof. Dr. F. Almasy)
der Universität Zürich

Pharmakologische und chemische
Untersuchungen über die Cholinesterase
in der Pansenwand des Rindes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

GIAN PIETRO TOGNI

von Semione (TI)

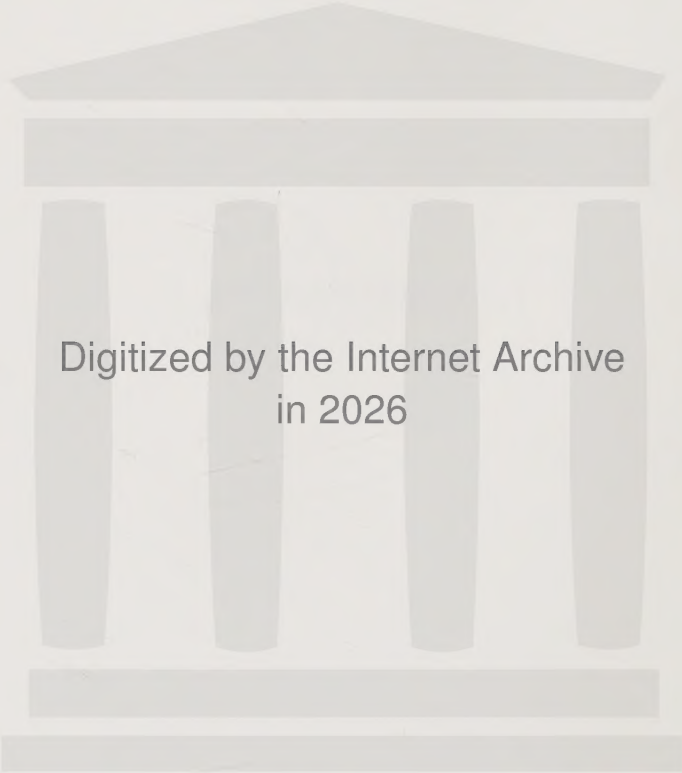
Genehmigt auf Antrag von Herrn Prof. Dr. H. Graf

Zürich 1953

Buchdruckerei Bolli & Böcherer AG., Schaffhausen



Ai miei cari genitori



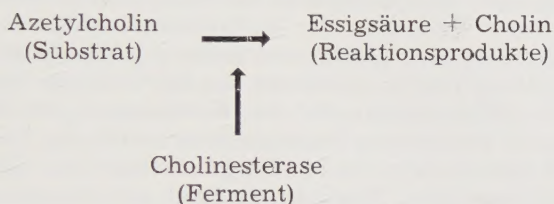
Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und historischer Ueberblick	1
II. Pharmakologischer Teil	3
A. Allgemeines	3
1. Azetylcholin und cholinergische Erregung	3
2. Das Azetylcholin-Cholinesterase-System	4
3. Problemstellung und Methodik	5
B. Eigene Untersuchungen	7
1. Einleitung	7
2. Technik	7
3. Resultate	8
a) Physostigmin	8
b) Arekolin	9
c) Veratrum-Alkaloide	9
d) Di-isopropyl-fluorophosphat	10
e) Diparcol	10
f) Azetylcholinchlorid und -jodid Azetylthiocholinjodid	11
4. Diskussion	12
III. Chemischer Teil	14
A. Theoretische Grundlagen	14
1. Allgemeines	14
2. Reaktionskinetik	15
3. Inhibitoren	16
4. Methoden zur Bestimmung der ChE-Aktivität	18
5. Histochemie	18
B. Eigene Versuche	19
1. Einleitung	19
2. Herstellung der Pansenwandextrakte	19
a) Vorversuche	19
b) Herstellung homogener Gewebssuspensionen aus Pansenwand	20
3. Titrimetrische Bestimmungen der ChE-Aktivität	21
a) Alkalimetrische Methode	21
b) Azidimetrische Methode	21
c) Jodometrische Methode	21
4. Resultate	24
Physostigmin	25
Arekolin	25
Veratrum-Alkaloide	25
Di-isopropyl-fluorophosphat	25
Diparcol	25
5. Diskussion	29
6. Versuche zum histochemischen Nachweis der ChE-Aktivität in der Pansenwand	34
IV. Zusammenfassung von Teil II und III	37
V. Literatur	38

I. Einleitung und historischer Ueberblick

Ursprünglich verstand man unter Cholinesterase jenes Ferment, das für die Hydrolyse des Azetylcholins im menschlichen und tierischen Organismus verantwortlich gemacht wurde:



Diese einfache Beziehung wurde später für Ferment und Substrat stark erweitert. Man fand verschiedene azetylcholin-spaltende Fermente, die sich je nach ihrer Herkunft (Tierart, Organ, Gewebe, Zelle) in wesentlichen Punkten unterscheiden und Substrate, die trotz mehr oder weniger vom Azetylcholin abweichender Struktur von den gleichen Fermenten hydrolysiert werden.

Es ist wahrscheinlich, dass bestimmten Hydrolasen im Organismus die Aufgabe zufällt, das dauernd entstehende Azetylcholin unschädlich zu machen. Ob aber eine spezifische «Azetylcholinesterase» existiert, und ob neben Azetylcholin andern Estern eine vergleichbare physiologische Bedeutung zukommt, lässt sich heute nicht mit Sicherheit sagen. Die vorliegende Arbeit nimmt deshalb auf Spezifitätsprobleme keinen Bezug. Sie beschränkt sich auf den Vergleich der pharmakologischen Wirkungen einiger Wirkstoffe auf die isolierte Pansenwand des Rindes mit dem inhibierenden Einfluss, den diese Stoffe auf die fermentative Spaltung von Azetylcholin durch Pansenwand-Gewebssuspensionen ausüben.

In der Tiermedizin wurde der pharmakologischen und toxikologischen Bedeutung der Cholinesterase-Inhibition bisher wenig Rechnung getragen. Die Tatsache aber, dass sich unter den phosphorhaltigen Insektiziden und Kampfstoffen sehr wirksame Cholinesterase-Inhibitoren befinden, macht dieses Problem auch für den Tierarzt wichtig.

Dale (1914) vermutet als erster, Azetylcholin verschwinde aus dem Organismus deshalb so rasch, weil es einer fermentativen Hydrolyse anheimfalle. Er schreibt: «In the blood at body temperature it seems not improbable, that an esterase contributes to the removal of the active ester from the circulation, and the restoration of the original condition

of sensitiveness.» *Abderhalden und Paffrath* (1926) kommen zum Schluss, im Dünndarm von Pferd und Schwein sei ein azetylcholinspaltendes Ferment vorhanden. *Loewi und Navratil* (1926) nehmen an, im Herzextrakt von Eskulenten liege ein Ferment vor, das die Verseifung des Azetylcholins zu beschleunigen vermöge. Durch Physostigmin und Ergotamin werde dieses Ferment *in vitro* gehemmt. Dieser Umstand bedinge die *in vivo* nach Applikation der genannten Alkaloide beobachtete Sensibilisierung des Herzens für Azetylcholin. *Plattner* (1926) weist auf die grosse Intensität der azetylcholinzerstörenden Wirkung des Blutes hin; *Plattner, Galehr und Koder* (1928) führen dies auf eine oberflächenkatalytische Aktivität der Erythrozyten zurück. *Engelhart und Loewi* (1930) machen für die Wirksamkeit des Blutes ein durch Physostigmin hemmbares Ferment verantwortlich. *Plattner und Hintner* (1930) untersuchen das Spaltungsvermögen der Extrakte verschiedener Kleintierorgane. *Stedman, Stedman und Easson* (1932) führen die Bezeichnung «Cholinesterase» ein.

Für die in der Folge stark angewachsene Literatur sei auf die Zusammenfassung von *Augustinsson* (1948, vollständige Literaturübersicht bis Februar 1948) und *Whittaker* (1951) verwiesen.

II. Pharmakologischer Teil

A. ALLGEMEINES

1. Azetylcholin und cholinergische Erregung*

Die Bedeutung des Azetylcholins bei der Reizbildung und Reizleitung im Nervensystem ist nicht genau umschrieben, und eine Abgrenzung chemischer Uebertragungsmechanismen von elektrischen ist schwierig. Es kann jedoch angenommen werden, dass Azetylcholin bei der Uebertragung von Impulsen auf cholinergisch innervierte Organe, bei der Kontraktion quergestreifter Muskulatur, in den Synapsen vegetativer Ganglien und wahrscheinlich in gewissen Zentren in Aktion tritt. *In vitro* wurde die Azetylcholinsynthese durch Nervengewebe wiederholt nachgewiesen (Quastel, Tennenbaum und Wheatley 1936, Feldberg 1943, Sanz 1943, v. Muralt und Schulthess 1944), wie auch die Produktion von Azetylcholin durch Nervenzellen *in vivo* (u. a. v. Muralt 1947).

Cholinergische Reaktionen können hervorgerufen werden entweder durch Reizung cholinergischer Nervenfasern, wobei als Vermittler Azetylcholin entsteht, oder durch sogenannte Parasympathikomimetika. Diese Wirkstoffe haben ihren Angriffspunkt an den gleichen Erfolgsorganen wie das Azetylcholin selbst. Dabei unterscheidet man eine «Muskarinwirkung» und eine «Nikotinwirkung». Erstere besteht in Erhöhung der Drüsensekretion, Sinken des Blutdruckes infolge Gefäßerweiterung, Verlangsamung der Herzstätigkeit und Kontraktion der glatten Muskulatur von Magen, Darm, Bronchien und Uterus.

Die «Nikotinwirkung» kann an drei verschiedenen Punkten ansetzen: am zentralen Nervensystem, am autonomen Nervensystem und an den Nervenendigungen der willkürlichen Muskulatur. Sie beruht auf einer Reizung oder, bei hoher Dosierung, auf einer Lähmung der Ganglien (Cushny 1941).

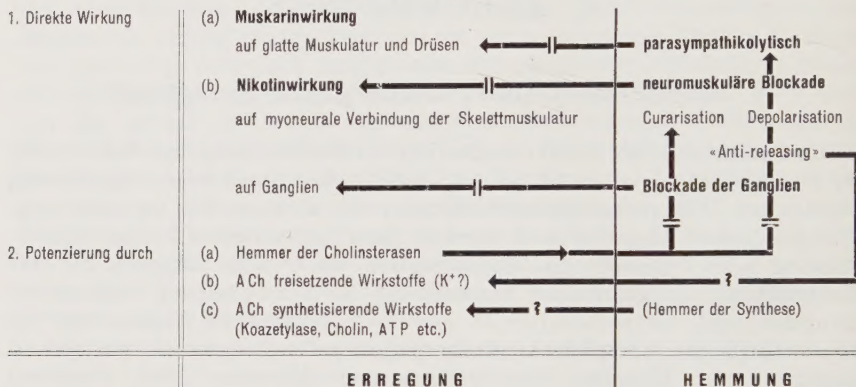
Eine weitere Möglichkeit, cholinergische Reaktionen hervorzurufen, stellt die Potenzierung des endogenen Azetylcholins dar. Diese kann erfolgen durch:

- (a) Verhinderung des Azetylcholinabbaus infolge Hemmung der Cholinesterasen,
- (b) Freiwerden von Azetylcholin aus sonst unwirksamen Verbindungen (verursacht durch Kalium-Ionen?),
- (c) Förderung der Azetylcholinsynthese (Koazetylase, Cholin, Adenosintriphosphorsäure etc.).

* Vergl. Koelle und Gilmann (1949) und Whitteridge (1948, elektrophysiologischer Standpunkt).

Das folgende, nach *Bergel* (1951) dargestellte Schema, gibt eine Uebersicht über die oben erwähnten Zusammenhänge.

Wirkung auf cholinergische Effektoren



2. Das Azetylcholin-Cholinesterase-System

Die Wirkungen des Azetylcholins (ACh) auf die cholinergischen Effektoren klingen normalerweise rasch ab, weil es durch die Cholinesterase (ChE) sofort in das 100 000 mal weniger wirksame Cholin und in Essigsäure zerlegt wird. Das ACh und die ChE greifen entscheidend ein in den Stoffwechsel aller Nervenzellen und sollen einen wichtigen Bestandteil darstellen im Mechanismus, der für die Entstehung und Fortpflanzung des Aktionspotentials verantwortlich gemacht wird. Eine Verminderung der ChE-Aktivität, sei es durch Krankheiten oder durch ChE-Inhibitoren, kann sich deshalb in Störungen äussern. In einer grossen Anzahl von Arbeiten wird die Frage erörtert, ob gewissen pathologischen Zuständen eine Störung des ACh-ChE-Systems zugrunde liegen könnte. U. a. wurden untersucht: Leberkrankheiten, Anämie, Tuberkulose, Karzinom, Dermatitis, Urämie, Schock, Intoxikation, Bronchialasthma, Diabetes, Myasthenie, Krankheiten des Nervensystemes, des Kreislaufes, der inneren Sekretion und der blutbildenden Gewebe, sowie allergische Zustände u. a. m. Die Resultate erlauben kein definitives Urteil; verschiedene Krankheiten gehen jedoch mit einer Veränderung der ChE-Aktivität einher.

Zu besonderer Bedeutung gelangte das ACh-ChE-System auf dem Gebiete der Anästhesie, die in vielen Fällen in die Physiologie der Nerv-Muskel-Uebertragung eingreift. Dadurch rückte eine «pharmakologische und physiologische Spielerei doch auch in den Brennpunkt eines praktischen Interesses» (*Schäfer* 1952).

Auf ChE-Aktivität untersuchte Gewebe von Vertebraten
(nach Augustinsson 1948, gekürzt)

Herz	++
Lunge	++
Speicheldrüsen	+++
Speichel	—
Magen (Schwein, Frosch)	++
Magensaft (Mensch, Kaninchen)	—
Pankreas	++
Pankreassaft	++
Leber	+++
Gallenblase, Galle	—
Darm	++
Milz	++
Niere	+
Nebennieren	++
Harnblase, Ureteren (Kalb)	++
Urin (Mensch)	—
Hoden (Mensch, Schwein)	+
Sperma, Prostata, Samenblase (Mensch)	(+)
Spermaflüssigkeit Hai (<i>Scyllium</i>)	+++
Ovar, Eileiter (Mensch, Schwein)	++
Uterus	++
Plazenta (Mensch)	+
Milch (Kuh)	—
Schilddrüse	++
Karotiskörperchen (Katze)	+
Thymus	+++
Auge: verschiedene Teile untersucht	+—?
Ohr: Perilymphe (Tauben)	+
Haut (Mensch, Katze)	+
Braunes Fett, «hibernating gland» (Ratte)	++
Rotes Knochenmark (Ratte)	++

3. Problemstellung und Methodik

Eine Hemmung der ChE muss sich theoretisch in einer vagalen Hypertonie oder Hypersensibilität äussern. Auf dieser Grundlage basieren unsere Versuche zum pharmakologischen Nachweis der ChE. Das Prinzip ist ersichtlich aus dem Blutegelversuch von *Fühner* (1918):

Ein in Ringerlösung suspendierter Rückenmuskel des Blutegels reagiert auf ACh-Dosen mit einer Kontraktion (Schwellenwert für ACh normalerweise bei 1 : 10 000 — 1 : 100 000). Unterzieht man ihn aber

einer Vorbehandlung mit Physostigmin in geringen, für sich allein unwirksamen Mengen, so wird seine Empfindlichkeit gegenüber ACh «um mehr als das Millionenfache» erhöht, sodass auch Spuren von ACh eine Kontraktion auslösen. Nach *Minz* (1932) ist diese Sensibilisierung einer Hemmung der im Blutegelmuskel vorhandenen ChE zuzuschreiben. Dadurch sollen auch kleine Mengen ACh, die sonst rasch der Hydrolyse anheimfallen, zur Wirkung gelangen. Ob aber neben einer Hemmung der ChE durch Physostigmin noch andere Mechanismen an der erregbarkeitssteigernden Wirkung beteiligt sind, ist nicht ohne weiteres auszuschliessen. Auch ist nicht abzuleiten, ob es sich um eine nervöse oder um eine muskuläre Wirkung handelt.

In diesem Zusammenhang stellen *Kahane und Levy* (1937) fest, dass nach einer maximal sensibilisierenden Physostigmindosis der nervenfreie Rückenmuskel des Blutegels keine feststellbare Abnahme der ChE-Aktivität zeigt. Dies sei darauf zurückzuführen, dass im Blutegelmuskel zwei verschiedene ChEn vorliegen, von denen nur eine durch kleinste sensibilisierende Physostigmindosen gehemmt werde. Erreicht man durch Auswaschen die ursprüngliche Sensibilität wieder, so verschwindet auch die Hemmung dieser ChE.

Die Uebertragung dieser Verhältnisse auf die glatte Muskulatur autonom innervierter Organe liegt nahe. Geht man von der Annahme aus, dass die Peristaltik isolierter, überlebender Organe oder Organteile durch das im Gewebe vorhandene oder dauernd nachgebildete ACh verursacht werde, und dass dieses ACh durch ChE-Inhibitoren vor dem fermentativen Abbau geschützt werden könne, so müssen diese Organe auf ChE-Inhibitoren gleich reagieren, wie auf ACh selber, im Bereiche des Magen-Darmes also mit Tonussteigerung, Frequenzerhöhung und Zunahme der Amplitude. In Analogie zum *Fühner'schen* Blutegelversuch wäre auch zu erwarten, dass der Schwellenwert für ACh tiefer liegt, wenn das Organ mit einem ChE-Inhibitor vorbehandelt wird.

Die erste Forderung hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ihre Bestätigung gefunden, indem Magen und Darm auf starke ChE-Inhibitoren (Physostigmin, DFP) wie auf eine lang anhaltende ACh-Reizung reagieren. Dabei bleibt immer noch die Frage offen, ob neben der ChE-Hemmung nicht auch andere Faktoren an der Auslösung dieser Reaktion beteiligt sind.

In Bezug auf die Herabsetzung der Reizschwelle für ACh durch Vorbehandlung mit ChE-Inhibitoren bestehen noch Unklarheiten. *Kahane und Levy* (1937) finden, dass die Wirkung des ACh auf das Duodenum der Ratte vor und nach der Behandlung mit Physostigmindosen, die für sich allein unwirksam sind, konstant bleibt, während die ins Wasserbad diffundierende ChE gehemmt wird. *Manning, Lang und Hall* (1937) dagegen stellen fest, dass die parasympathische Erregbarkeit durch kleine Physostigmindosen erhöht wird.

Schliesslich ist noch zu erwarten, dass die normalerweise rasch abklingende Reaktion auf ACh-Reize durch Vorbehandlung mit ChE-Inhibitoren eine Verlängerung erfährt.

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Einleitung

Es war die Frage zu beantworten, ob die Reaktion der Pansenwand des Rindes auf verschiedene Gifte mit einer Hemmung der Pansenwand-ChE in Zusammenhang zu bringen sei. Zu diesem Zwecke wurden am isolierten, überlebenden Pansenpräparat verschiedene Körper geprüft: 1. Als Vertreter der typischen ChE-Inhibitoren mit parasympathikomimetischer Wirkung das *Physostigmin* und das *Di-isopropyl-fluorophosphat* (DFP), 2. das Parasympathikomimetikum *Arekolin*, dem kein hemmender Einfluss auf die ChE zugesprochen wird, 3. das gegen Parkinsonismus verwendete *Diparcol*, ein spezifischer Hemmer der «Pseudo-ChE» und 4. die *Veratrum-Alkaloide*, deren Einfluss auf die ChE nicht eindeutig definiert ist. Als Ergänzung wurden die Wirkungen von Azetylcholinchlorid (bzw. -jodid) mit denen des im chemischen Teil verwendeten Azetylthiocholins (A Th Ch J) verglichen.

2. Technik

Die von *Lienert* (1950) beschriebene Anordnung (Pansenstreifen in körperwarmer Nährlösung, Sauerstoffzufuhr) diente in allen Versuchen als Grundlage. Verglichen wurden die kymographisch festgehaltenen Kontraktionsänderungen des Pansenstreifens.

Reagentien und Lösungen: (siehe auch S. 33/34)

- Tyrodelösung (pro Liter): NaCl 8,0; KCl 0,2; CaCl₂ 0,2; MgCl₂ 0,1; NaH₂PO₄ 0,05; NaHCO₃ 1,0,
- Azetylcholin-Chlorid Ph. H. V,
Azetylcholin-Jodid,
Azetylthiocholin-Jodid (Präp. Hoffmann-La Roche).
Die wässrigen Lösungen wurden täglich frisch hergestellt,
Aufbewahrung bei + 4° C.
- Physostigminsalizylat Ph. H. V (in heissem Wasser gelöst),
- Arekolinhydrobromid Ph. H. V,
- Alcaloidetum Veratri hydrochloricum (Präp. Siegfried, Zofingen),
- Di-isopropyl-fluorophosphat, DFP (in Propylenglykol gelöst),
- Diparcol (Präp. SPECIA, Paris).

3. Resultate

a) Physostigmin (Abb. 1 a)

Physostigmin allein ruft in der Konzentration $1 : 10^7$ ($2,42 \times 10^{-7}$ molar) meist keine deutliche Kontraktion des Pansenstreifens hervor [Kurve a)₂], dagegen regelmässig in den Konzentrationen $1 : 10^6$ und $1 : 10^5$. Ausnahmsweise tritt schon nach Physostigmin $1 : 10^7$ eine Tonussteigerung mit Vergrößerung der Amplitude ein [Kurve a)₁]. Die Physostigminvorbehandlung hat in vielen Fällen zur Folge, dass der Pansenstreifen auf sonst unwirksame ACh-Dosen ($1 : 10^8 = 5,5 \times 10^{-8}$ molar) mit einer deutlichen, lange anhaltenden Tonussteigerung reagiert, die in der Regel auch mit Frequenzerhöhung und Vergrößerung der Amplitude einhergeht [Kurven a)₁ und a)₂].

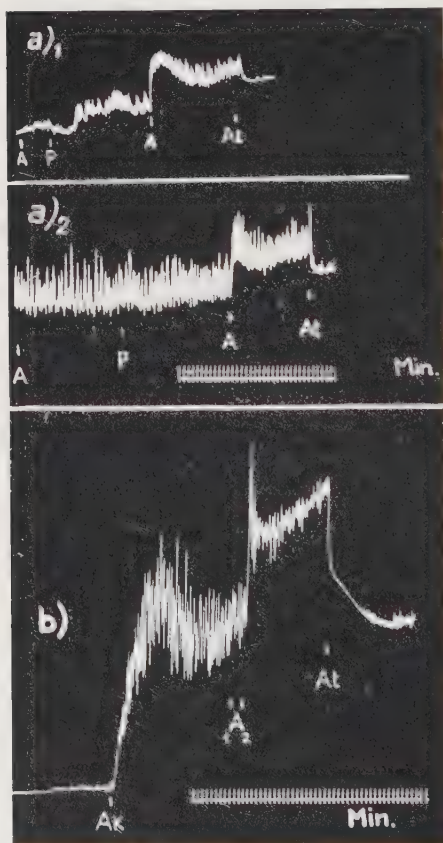


Abb. 1

Kurven a)₁ und a)₂:

A = Azetylcholin $1 : 10^8$
 P = Physostigmin $1 : 10^7$
 At = Atropin $1 : 10^6$

Kurve b):

Ak = Arekolin $1 : 10^7$
 A₁ = Azetylcholin $1 : 10^8$
 A₂ = Azetylcholin $1 : 10^7$
 At = Atropin $1 : 10^6$

b) Arekolin (Abb. 1 b)

Arekolin $1:10^7$ bewirkt regelmässig starke Tonussteigerung, Frequenzerhöhung und Zunahme der Amplitude. Die Wirkung ist anhaltend und durch Atropin beeinflussbar. Nach Arekolin $1:10^7$ ist keine Sensibilisierung des Pansenstreifens für ACh $1:10^8$ festzustellen.

c) Veratrum-Alkaloide (Abb. 2 c)

In mittleren und niedrigen Konzentrationen ist keine Wirkung zu beobachten. In hohen Konzentrationen tritt eine vorübergehende schlaffe Lähmung mit Aussetzen der Peristaltik ein. ACh $1:10^8$ ist auch nach Vorbehandlung mit Veratrum-Alkaloiden unwirksam.

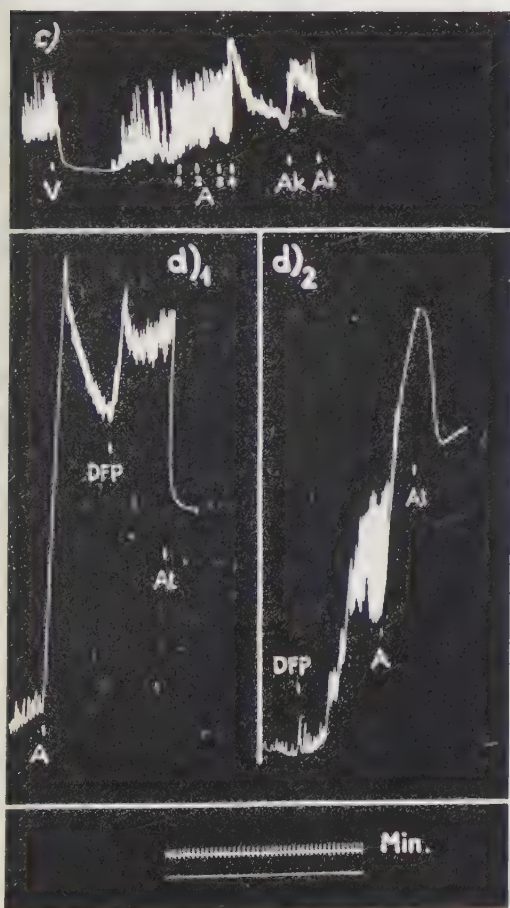


Abb. 2

Kurve c):

V = Veratrum-Alkaloide
0,625 g auf 1000 cc
A = Azetylcholin
1 = $1:10^9$, 2 = $1:10^8$,
3 = $1:10^7$, 4 = $1:10^6$
Ak = Arekolin $1:10^6$
At = Atropin $1:10^6$

Kurve d)1:

A = Azetylcholin $1:10^6$
DFP = DFP 10^{-6} m
At = Atropin $1:10^6$

Kurve d)2:

DFP = DFP 10^{-6} m
A = Azetylcholin $1:10^8$
At = Atropin $1:10^6$

d) Di-isopropyl-fluorophosphat (Abb. 2 d)

DFP in der Konzentration 10^{-6} molar hat in den meisten Fällen keine Wirkung; ausnahmsweise ist langsame Tonussteigerung mit Frequenzerhöhung zu beobachten. Der Pansenstreifen wird für ACh $1 : 10^8$ empfindlich. Nach DFP 10^{-4} molar tritt eine zunehmende Tonussteigerung ein; ist ein bestimmter Tonus erreicht, so setzt eine sehr starke Peristaltik ein. ACh $1 : 10^8$ bewirkt dann eine sofort einsetzende, starke Kontraktion [Kurve d)₂, «Superposition»]. Führt man eine Vorbehandlung des Pansenstreifens mit ACh $1 : 10^8$ durch und gibt während des Abfallens der ACh-Kurve DFP 10^{-6} molar zu, so kann plötzliche Tonussteigerung, gelegentlich verbunden mit Vergrößerung der Amplitude und Frequenzsteigerung, eintreten [Kurve d)₁].

e) Diparcol (Abb. 3)

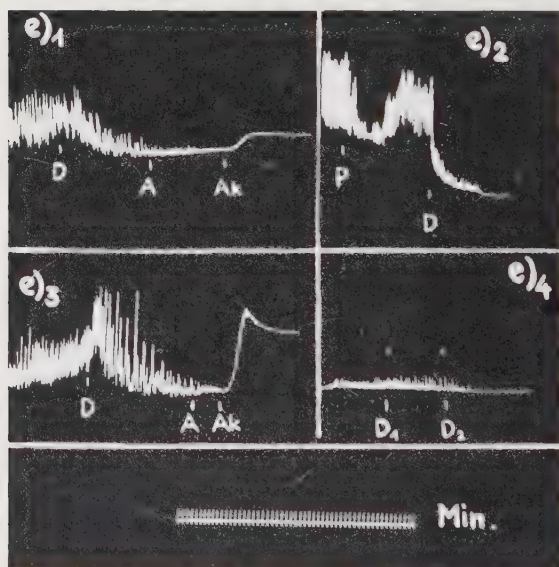


Abb. 3

Kurve e)₁:

D = Diparcol 10^{-4} m
in H_2O

A = Azetylcholin $1 : 10^8$

Ak = Arekolin $1 : 10^6$

Kurve e)₂:

P = Propylenglykol
10 cc

D = Diparcol 10^{-4} m
in Propylenglykol

Kurve e)₃:

D = Diparcol 10^{-4} m

A = Azetylcholin $1 : 10^7$

Ak = Arekolin $1 : 10^6$

Kurve e)₄:

D₁ = Diparcol 10^{-5} m

D₂ = Diparcol 10^{-4} m

Diparcol 10^{-5} molar verursacht gelegentlich, Diparcol 10^{-4} molar regelmäßig eine Tonussenkung mit langsamem Verschwinden der Peristaltik. Löst man das Diparcol in 10 cc Propylenglykol, so kann vor der Diparcolwirkung eine reversible Lähmung auftreten, die auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist [Kurve e)₂]. Die Empfindlichkeit des Pansenstreifens für ACh ist nach Diparcol deutlich herabgesetzt (ACh $1 : 10^6$ unwirksam); Arekolin $1 : 10^6$ ist auch dann noch wirksam [Kurve e)₁ und e)₃].

f) Azetylcholin, Azetylthiocholin (Abb. 4)

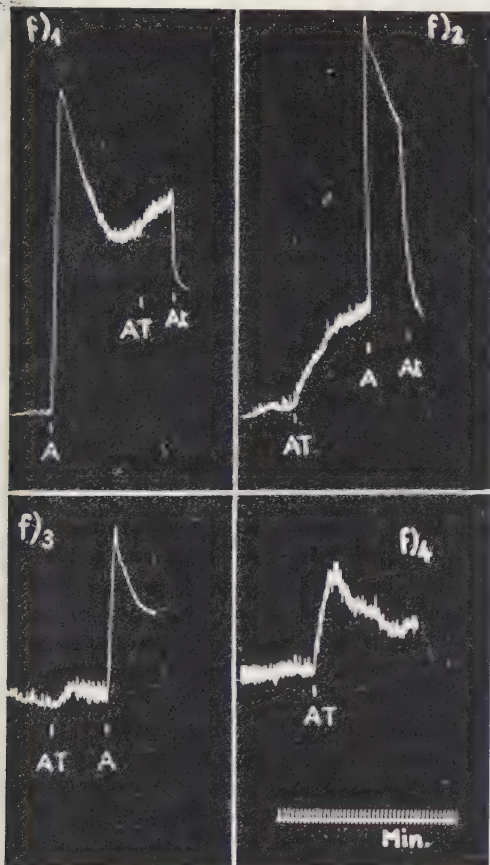


Abb. 4

Kurven f₁, f₂, f₃:

A = Azetylcholin

$5,5 \times 10^{-7} \text{ m}$

AT = Azetylthiocholin

$5,5 \times 10^{-7} \text{ m}$

At = Atropin $1 : 10^6$

Kurve f₄:

AT = Azetylthiocholin

$5,5 \times 10^{-6} \text{ m}$

Aequimolare Lösungen von ACh-Jodid und ACh-Chlorid unterscheiden sich in ihrer Wirkung nicht wesentlich. Dagegen erweist sich Azetylthiocholin-Jodid in der gleichen Konzentration als bedeutend weniger wirksam. Seine Wirkung setzt meist verzögert und erst in 10facher Konzentration mit gleicher Stärke wie bei ACh-Jodid und ACh-Chlorid ein [Kurve f₄]. Die Reihenfolge der Applikation hat keinen feststellbaren Einfluss [Kurven f₁, f₂ und f₃]. Der Abfall der ACh-Kurve ist nach Vorbehandlung mit AThChJ häufig verzögert.

4. Diskussion

Im Allgemeinen reagiert der Magen-Darm auf *Physostigmin* mit Tonussteigerung und vermehrter Peristaltik (Cushny 1941, Sollmann 1945, Bovet, Bovet-Nitti 1948). Dies trifft in unseren Versuchen auch für die isolierte Pansenwand des Rindes zu. Dazu kommt das Sinken der Reizschwelle für ACh durch *Physostigmin*vorbehandlung, wie dies schon Graf (1952 a) feststellte, und der verzögerte Abfall der ACh-Kurve. Somit sind die auf S. 5/6/7 aufgestellten Forderungen erfüllt und es scheint, dass die periphere Komponente der *Physostigmin*-wirkung durch eine Hemmung der ChE zustande kommt. Die mit DFP erhaltenen Kurven bestärken diese Annahme. Sie unterscheiden sich in den wesentlichen Punkten nicht von den *Physostigmin*kurven, ausser dass die wirksamen Mengen beim DFP allgemein höher liegen. Dies kann eventuell auch mit einer Abnahme des DFP-Gehaltes der Propylenglykol-Stammlösung (3 Wochen alt) zusammenhängen. Atropin wirkt bei *Physostigmin* und DFP als Antagonist.

Anders verhält sich der Pansenstreifen gegenüber *Arekolin*. Schon in niedrigen Konzentrationen kommt es zu einer sofortigen Tonussteigerung mit Frequenzerhöhung und Zunahme der Amplitude (in Uebereinstimmung mit Graf 1952 b). Für ACh in unerschwelligen Dosen ist der Pansenstreifen auch nach *Arekolin*vorbehandlung nicht empfindlich und der Abfall der ACh-Kurve ist nicht wesentlich verzögert. Damit haben wir keine Anhaltspunkte für eine Hemmung der Pansenwand-ChE durch *Arekolin*. Prinzipiell scheint am Kurvenbild zwischen ACh- und *Arekolin*wirkung kein Unterschied zu bestehen. Nur steht der Körper dem ACh als endogenem Gift nicht wehrlos gegenüber. Es bleibt abzuklären, ob experimentell durch zunehmende *Arekolindosen* ein Organismus zur Bildung von *arekolinzerstörenden* Fermenten angeregt werden kann.

Die Wirkung der *Veratrum*-Alkaloide auf die Pansenwand dürfte komplexer Art sein. In Uebereinstimmung mit Stücklin (1952) fand ich bei mittleren und niedrigen Konzentrationen keinen deutlichen Effekt; die Anregung der Peristaltik nach ACh-Vorbehandlung war meist undeutlich. Das von Rave (1952) nach *Veratrin* (50—100 γ auf 100 cc Ringerlösung) regelmässig beobachtete Einsetzen von Spontanrhythmik konnte ich mit den *Veratrum*-Alkaloiden nicht reproduzieren. Dagegen trat nach sehr hohen Dosen (0,625 g auf 1000 cc) meist eine deutliche Lähmung auf, die im Verlaufe von 10 bis 20 Minuten verschwand und einer verstärkten Peristaltik Platz machte. Die Empfindlichkeit für ACh war nicht erhöht, sondern eher vermindert. Wenn auch eine Hemmung der ChE durch gewisse *Veratrum*-Alkaloide anhand dieser Versuche nicht ausgeschlossen werden kann, so muss doch für die Erklärung der *Veratrum*wirkung eine andere Basis gesucht werden [vergl. Krause (1952)].

Diparcol müsste theoretisch auf den Magen-Darm erregend wirken, a) weil es ein spezifischer Inhibitor der «Pseudo-ChE» ist (*Gordon* 1948) und b) weil sich die Hemmung der «Pseudo-ChE» in Zunahme von Tonus und eventuell Amplitude zeigt [*Koelle, Koelle und Friedenwald* (1950), Versuche am Katzenileum]. Am Pansenstreifen ruft *Diparcol* jedoch in vielen Fällen eine schlaffe Lähmung hervor.

Die *Azetylthiocholin*-Kurven bestätigen die Feststellung von *Renshaw, Dreisbach, Ziff und Green* (1938), wonach das azetylierte Thiocholin in «muskarinischer» Richtung viel weniger wirksam sei als das ACh. *Alexander, Dillon und Jordan* (1938) erklären die kurze Wirkungsdauer der Thiocholinester damit, dass diese im Organismus rasch abgebaut werden. Am Pansenstreifen ist die AThChJ-Wirkung zwar gering, aber lange anhaltend; dies spricht nicht für einen raschen Abbau, sondern eher für eine Entgiftung des ACh durch Einführung der Thio-Gruppe. Dadurch würde auch verständlich, dass in vivo die Symptome nach Injektion von AThChJ durch Physostigmin nicht beeinflusst werden können.

III. Chemischer Teil

A. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1. Allgemeines

Unter den Cholinesterasen lassen sich mindestens zwei Typen unterscheiden, die sich in Bezug auf ihre Substrate und Inhibitoren verschieden verhalten:

spezifische ChE «true ChE» «e-Typ»	unspezifische ChE «Pseudo-ChE» «s-Typ»
--	--

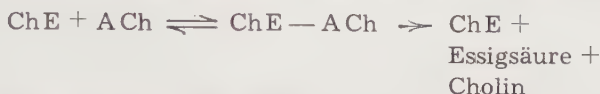
Alle bisher untersuchten «echten» oder «spezifischen» ChEn vermögen ausser ACh und verwandten Cholinestern verschiedene Nichtcholin-Carboxylester zu hydrolysieren. Die optimale Azygruppe ist hierbei stets Azetat (*Whittaker* 1951). Bei den «unspezifischen» ChEn ist die Affinität zum ACh noch weniger ausgeprägt. In der vorliegenden Arbeit wird auf die Spezifitätsfrage nicht weiter eingegangen.

Die chemische Struktur der ChEn ist noch weitgehend ungeklärt. *Augustinsson* (1944) bezeichnet sie als Proteine mit isoelektrischem Punkt pH 4,36 (Serum-ChE des Pferdes) bzw. pH 4,65—4,70 (Erythrozyten-ChE des Pferdes). Die Fermentaktivität soll sich nach *Faber* (1943) und *Augustinsson* (1944) auf die Albuminfraktion beschränken. Aus elektrophoretischen Untersuchungen geht indessen hervor, dass die α - und β -Globulinfraktion des Serums Träger der ChE-Aktivität sind (*Glick, Glaubach und Moore* 1942). Bei der Trennung der Pferdeserumproteine durch Papierelektrophorese wandert der aktivste Bestandteil mit der β -Globulinfraktion (*Togni und Meier* 1953). Durch fraktioniertes Ausfällen innerhalb der Serumglobulinfraktion des menschlichen Blutes lassen sich sehr aktive ChE-Präparate gewinnen. Eine Methode zur Herstellung von ChE-Präparaten aus dem elektrischen Organ von *Electrophorus* wurde von *Rothenberg und Nachmansohn* (1947) beschrieben.

Das Ferment kann durch Dialyse inaktiviert und durch Zugabe des Dialysates (*Nachmansohn und Lederer* 1939) oder von Metallionen (*Masart und Dufait* 1939, 1940; *Nachmansohn* 1940) reaktiviert werden. Vor allem 2-wertige Ionen zeigen diese Wirkung und nach *Massart und Dufait* ist Ca^{++} der physiologische Aktivator der ChE.

2. Reaktionskinetik

Die auf Grund kinetischer Untersuchungen der Invertasewirkung von *Henri* (1903) aufgestellte und von *Michaelis und Menten* (1913) ausgebaute Theorie der fermentativen Zwischenstoffkatalyse lässt sich auf das ACh-ChE-System anwenden. Dies bedeutet, dass das Enzym ChE mit dem Substrat ACh eine mehr oder weniger labile Enzym-Substratverbindung eingeht, welche in der Folge unter Aufspaltung des Substrates und Rücklieferung des freien Enzyms spontan zerfällt:



Da die erste Reaktion zur Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes führt, hemmt ein Ueberschuss an Substrat eventuell die Hydrolysegeschwindigkeit, indem noch andere Enzym-Substratverbindungen, etwa vom Typ ChE (ACh)₂ entstehen können, die nicht zur Spaltung führen. Ein hemmender Einfluss der Reaktionsprodukte ist gemäss dem Massenwirkungsgesetz in der Regel zu erwarten, doch braucht er zu Beginn der Umsetzung oft noch nicht berücksichtigt zu werden. Durch einen bedeutenden Ueberschuss an Cholin lässt sich die fermentative Aufspaltung des ACh weitgehend unterbinden (*Marquart und Vogg* 1952).

Die dargelegten Zusammenhänge gelten in so einfacher Form lediglich für sehr verdünnte Lösungen. Salzzusätze können durch Beeinflussung der Aktivitäten den Verlauf der fermentativen Spaltung bedeutsam ändern (*Mendel und Rudney* 1945; *Myers* 1950). Eine übermässige Erhöhung der Pufferkonzentration erscheint daher unzweckmässig (*Myers* 1952).

In Gewebsauszügen, besonders in Glycerinextrakten, ist die ChE ziemlich stabil (*Glick* 1937, *Riechert und Schnarrenberger* 1942). Im Blutserum wurde ihre Haltbarkeit durch verschiedene Autoren nachgewiesen. *Zachowski und Ammon* (1943) stellten fest, dass im Vollblut die ChE-Aktivität mit der Zeit zunimmt (Uebergang von ChE aus den Erythrozyten ins Plasma?). Eine 42 Jahre alte Probe von aseptisch gewonnenem, hämolysiertem Pferdeblut (im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt) zeigte bis zu 85 % der ursprünglichen ChE-Aktivität (*Keilin und Wang* 1947).

Die Reaktionskinetik der fermentativen ACh-Spaltung beeinflussen wesentlich:

a) Die Temperatur

Plattner und Mitarbeiter (1928), *Vahlquist* (1935), *Abdon und Uvnaes* (1937), sowie *Glick* (1939) prüften den Temperaturkoeffizienten der fer-

mentativen ACh-Spaltung (Blut-ChE) innerhalb des Bereiches reversibler Beeinflussung. Das Temperaturoptimum der ChE-Aktivität von Blutserum und von Nervengewebe liegt bei 37—40° C (Literatur s. *Augustinsson* 1948). Die irreversible Hitzeinaktivierung der ChE beginnt um 56° C herum (*Loewi und Navratil* 1926, *Plattner und Hintner* 1930, *Glick* 1939), bei 70° C ist die Aktivität vollständig verschwunden (*Abderhalden und Paffrath* 1926, *Kahane und Levy* 1936 a, *Wieczorek* 1937). Gefriertrocknen beeinträchtigt die ChE-Aktivität nicht (*Anfinsen, Lowry und Hastings* 1942, *Boell und Shen* 1944, *Boell* 1945, *Augustinsson* 1948).

b) Die Wasserstoff- bzw. Hydroxylionenkonzentration

Das pH-Optimum der Serum-ChE liegt bei

8,0 (*Easson und Stedman* 1936)

8,4 (*Bernheim und Bernheim* 1936)

8,5 (*Glick* 1937, 1938)

8,0—8,5 (*Werle und Uebelman* 1938)

dasjenige der Erythrozyten-ChE bei

7,5—8,0 (*Alles und Hawes* 1940).

Nach *Werle und Uebelman* (1938) ist die Pferdeblutserum-ChE bei pH 2 irreversibel inaktiviert; auf der alkalischen Seite ist eine starke Abnahme der ChE-Aktivität erst bei pH 11 zu verzeichnen. Die Erythrozyten-ChE ist bei pH 4,5 bereits vollständig inaktiviert (*Augustinsson* 1944, 1948).

Ultraviolette Strahlen sollen die ChE-Aktivität vermindern (*Loewi und Navratil* 1926), was von späteren Autoren indessen bestritten wird (vergl. *Stüttgen* 1947). Ueber einen Einfluss sichtbaren Lichtes ist nichts bekannt (*Augustinsson* 1948). *Kwiatkowski* (1936) berichtet, dass Röntgenstrahlen keinen eindeutigen Effekt ausübten.

3. Inhibitoren

Die Theorie der ChE-Hemmung soll in dieser Arbeit nicht eingehend erörtert werden. Grundsätzlich gilt, dass zwischen Ferment und Inhibitor vergleichbare Wechselwirkungen (chemische bzw. adsorptive Affinitäten) wie zwischen Ferment und Substrat vorliegen.

Eine grosse Zahl von Verbindungen wurde in Bezug auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht (tabellarische Uebersicht bei *Augustinsson* 1948). Der Einfluss vieler Alkaloide auf die Serum-ChE des

Pferdes ist von *Beaujard* (1944) beschrieben worden. Der stärkste in der Natur gefundene Inhibitor ist das Physostigmin; seine Wirkung ist reversibel. In der Gruppe der irreversibel hemmenden Gifte stehen gewisse organische Phosphorverbindungen im Vordergrund (TEPP, DFP).

Die folgende Literaturübersicht beschränkt sich auf die wichtigsten Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen:

a) Physostigmin

Hemmung der Spaltung von Azetylcholinchlorid (1 : 500) mittels Physostigmin (*Beaujard* 1944):

Physostigminkonzentration	1 : 10 ⁴	1 : 10 ⁵	1 : 10 ⁶	1 : 10 ⁷
Hemmung in %	96	93	89—93	58—64

Das Ferment geht mit dem Physostigmin eine reversible Bindung ein, die durch Dialyse gelöst werden kann. *In vivo* wird Physostigmin durch den Organismus abgebaut oder mit dem Harn ausgeschieden (*Augustinsson* 1948).

b) Arekolin

Beaujard (1944) stellte fest, dass Arekolin bis zu einer Konzentration von 1 : 10⁴ keinen hemmenden Einfluss auf die Serum-ChE des Pferdes ausübt.

c) Veratrum-Alkaloide

Ueber die Hemmung der ChE durch Veratrum-Alkaloide liegen folgende Literaturangaben vor: *Forster* (1933), *Kroll* (1934), *Nachmansohn und Schneemann* (1945). *Beaujard* (1944) findet für Veratrin:

Veratrinkonzentration	1 : 10 ⁴	1 : 10 ⁵	1 : 10 ⁶	1 : 10 ⁷
Hemmung in %	45—55	30—40	10—20	—

d) Di-isopropyl-fluorophosphat (DFP)

Die Literatur über DFP ist sehr umfangreich (s. *McCombie und Saunders* 1946, *Whittaker* 1951). Die Hemmung der ChE ist progressiv und irreversibel (*Mazur und Bodansky* 1946, *Nachmansohn, Rothenberg und Feld* 1948). Sie tritt bereits bei Konzentrationen von etwa 1 : 10¹¹ in Erscheinung.

e) Diparcol

Diparcol erweist sich als ein spezifischer Inhibitor der Darmmukosa-ChE (= Butyrylcholinesterase; *Gordon* 1948, *Todrick* 1952) und hemmt in Konzentrationen von 10⁻³ m die Serum-ChE des Menschen (*Meyer* 1952) und des Pferdes (eigene Versuche) etwa gleich stark wie DFP.

4. Methoden zur Bestimmung der ChE-Aktivität

Die direkte Messung der ChE-Aktivität beruht auf der Erfassung der bei der Azetylcholin- bzw. Azetylthiocholinhydrolyse entstehenden Zerfallsprodukte. Die üblichen Methoden sind indirekt; es liegt ihnen die Bestimmung des durch die freigesetzte Essigsäure verursachten pH-Abfalles (Elektrometrie) oder des aus einem Bikarbonatpuffer entwickelten CO₂ (Manometrie) zu Grunde. Bei den titrimetrischen Methoden wird die entstehende Essigsäure mit NaOH unter Zuhilfenahme eines Indikators titriert (Literatur s. *Augustinsson* 1948). *Glick* (1937) und *Sawyer* (1943) verwenden eine modifizierte Titration. Die exaktere elektrometrische Titration benötigt keinen Indikator (*Scoz und Cattaneo* 1937, *Barbour und Dickerson* 1939, *Glick* 1937, *Alles und Hawes* 1940, *Sanz* 1944, *Schümmelfeder* 1947, *Delanois und Casier* 1946).

Grosse Verbreitung hat die manometrische Methode gefunden (*Warburgmanometer*), wie sie von *Ammon* (1933) eingeführt wurde. Die Verfolgung des pH-Abfalles (*Michel* 1949) dient als Grundlage zahlreicher Untersuchungen besonders auf klinischem Gebiet (vergl. *Strehler und Meyer* 1952).

Ueber weitere Methoden berichtet *Augustinsson* (1948). In der vorliegenden Untersuchung wurde hauptsächlich die jodometrische Methode von *Meyer* (1952) verwendet, die im experimentellen Abschnitt eingehend beschrieben wird.

5. Histochemie

Ein erstes Verfahren zum histochemischen ChE-Nachweis wurde von *Gomori* (1948) veröffentlicht. Als Substrat dienen langkettige Fettsäureester des Cholins, die von verschiedenen Geweben (allerdings bedeutend langsamer als Azetylcholin) gespalten werden. *Koelle und Friedenwald* (1949) nehmen an, dass durch dieses Verfahren unspezifische Esterasen nachgewiesen werden. Diese Autoren schlagen als Substrat Azetylthiocholin (A ThCh) vor, welches durch Cholinesterasen noch stärker als ACh hydrolysiert wird. *Koelle* (1950 a, b) verfeinerte diese Methode, indem er durch differenzierte Hemmung mit DFP die Unterscheidung verschiedener ChE-Typen ermöglichte. Für die Lokalisation der unspezifischen ChE wird Butyrylthiocholin (BuThCh) als Substrat verwendet.

Cholinesterasen können auf diese Art im *Ileum* der Ratte und Katze, in den *Nuclei gracilis* und *cuneatus* der Ratte, im Nebennierenmark und im *Ggl. cervic. sup.* der Katze, sowie in den motorischen Endplatten von Interkostalmuskulatur (Ratte) nachgewiesen werden.

Eine neuere Methode von *Ravin, Tsou und Seligman* (1951) liefert im allgemeinen die gleichen Resultate. In der Färbung einzelner Zellstrukturen lassen sich feinere Nuancen erkennen; auch fehlt hier die Kernfärbung vollständig.

Die histochemischen Methoden liefern wichtige Aufschlüsse über die Lokalisation der ChEn in den Geweben; in Verbindung mit der quantitativen Aktivitätsbestimmung dürften sie zur Klärung der Frage nach der funktionellen Bedeutung der ChEn wesentlich beitragen.

B. EIGENE VERSUCHE

1. Einleitung

Gemäss den entsprechenden Ausführungen im Abschnitt A stehen für die chemische Prüfung der Pansenwand-ChE zwei Wege offen: die Aktivitätsbestimmung in Pansenwandextrakten und der histochemische Nachweis. Da das Ziel meiner Arbeit in der Untersuchung des Einflusses von Giften auf die Pansenwand-ChE bestand, verlegte ich das Hauptgewicht auf die Aktivitätsbestimmungen. Aus Pansenwandmuskulatur gewonnene Gewebssuspensionen zeigten eine ChE-Aktivität, die den einwandfreien Nachweis der fraglichen Hemmungswirkungen gestattete. Die histochemischen Untersuchungen mussten provisorisch abgeschlossen werden, nicht zuletzt deshalb, weil betreffs des histologischen Aufbaus und insbesondere der feineren Innervation der Pansenwand zur Zeit nur spärliche Angaben vorliegen.

2. Herstellung der Pansenwandextrakte

a) Vorversuche

Die Pansenwand des Rindes mit ihren zähen, elastischen Muskelschichten ist ein ungünstiges Ausgangsmaterial für die Herstellung von Gewebsextrakten. Nachdem das übliche Zerreiben mit Sand bzw. das Zerkleinern tiefgefrorener Gewebsstücke zu keinen befriedigenden Ergebnissen geführt hatte, erwies sich das Zerkleinern in einem vorgekühlten Desintegrator (mit rotierenden Messern, Marke Cuisto) als brauchbares Vorgehen, sofern dem autolytischen Säuerungsprozess durch hinreichende Pufferung begegnet wurde. Bei zu hoher Pufferkonzentration trat Ausflockung der Extrakte ein, wobei deren Aktivität stark abnahm. Durch Zentrifugieren (20 Min. bei 3000 T/Min.) wurde die Trübung der Extrakte weitgehend behoben. Bei zu langem Abzentrifugieren trat ebenfalls Ausflockung ein.

fugieren sank die Aktivität stark. Zusätze von Glyzerin zur Extraktionsflüssigkeit, wie sie *Glick* (1937) empfiehlt, ergaben keine merklich aktiveren Extrakte.

Auf Grund der dargelegten Erfahrungen entschied ich mich für das folgende Vorgehen:

b) Herstellung homogener Gewebssuspensionen aus Pansenwand

Verwendete Chemikalien:

I Kalium phosphoricum monobasicum n. *Sörensen*,

K-Primärphosphat, KH_2PO_4 , MG 136,13

Lösung $1/15$ molar = 9,078 g ad 1000 cc Aqua bidest.

II Natrium phosphoricum bibasicum n. *Sörensen*,

Na-Sekundärphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, MG 178,05

Lösung $1/15$ molar = 11,876 g ad 1000 cc Aqua bidest.

Glycerinum Ph. H. V

Lösung A:

Wie Lösung B, dazu 30 % Glyzerinzusatz

Lösung B:

Pufferlösung pH 7,4 =

1,00 Volumteil Primärphosphatlösung $1/15$ molar

4,26 Volumteile Sekundärphosphatlösung $1/15$ molar

Technik:

1. Entnahme eines Stückes Pansenwand möglichst rasch (innert ca. 30 Minuten) nach der Schlachtung und Verbringen in Eiswasser.
2. Abpräparieren der Schleimhaut.
3. 20 g Pansenwand (ohne Schleimhaut) werden in 100 cc eiskalte Lösung A gelegt, mit der Schere in kleine Stücke zerschnitten und im Desintegrator (Cuisto) zerkleinert. Der Becher dieses Apparates wird vor Gebrauch auf etwa -28°C abgekühlt.
4. Der erhaltene Brei wird im Verhältnis 2 : 3 mit Lösung B gemischt, durch Gaze filtriert und etwas stehen gelassen (dabei entweicht ein Teil der Luftblasen). Schliesslich wird die Suspension 5 Minuten lang in einem Potterapparat (*Potter und Elvehjem* 1936) behandelt.

Die Gewebssuspension ist leicht getrübt und schwach gelblich. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank ist sie mindestens 1 Woche haltbar, wobei ihre ChE-Aktivität eher zunimmt, wahrscheinlich durch Herausdiffundieren des Fermentes aus dem Zellverband der suspendierten Gewebspartikeln.

3. Titrimetrische Bestimmung der ChE-Aktivität

a) Alkalimetrische Methode

Als Ausgangspunkt wurden in den Vorversuchen die Angaben von *Beaujard* (1944) benützt. Zunächst ist das Spaltungsvermögen von Pferdeserum bei variiertter Verdünnung ermittelt worden. Als Indikator diente Kresolrot, dessen Farbumschlag von rot nach gelb (pH 8,8 $\rightarrow$ 7,2) in den trüben Extrakten jedoch selten mit Sicherheit festzustellen war, weshalb auf eine zahlenmässige Wiedergabe der Resultate verzichtet wird.

Der Ersatz des Indikators durch die elektrometrische pH-Kontrolle mittels hochohmiger Glaselektrode und Röhrenpotentiometer (*Coleman*)* erlaubt auch bei trüben Extrakten eine exakte Titration, doch gestaltet sich die Messung ziemlich umständlich. Der Extrakt wird mit Pufferlösung verdünnt und elektrometrisch auf pH 8,00 eingestellt. Zu Aliquoten des Gesamtextraktes (die im Wasserbad auf $38,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ gehalten werden) setzt man ACh-Lösung (pH 8,00) in der gewünschten Menge zu, stoppt die Fermentreaktion in bestimmten Zeitabständen, z. B. nach 5, 10, 15 und 20 Minuten durch Zugabe von Physostigmin- oder DFP-Lösung (pH 8,00) und titriert mit NaOH 0,05 n elektrometrisch. Nach Abzug des Leerwertes (NaOH-Verbrauch des Ansatzes ohne ChE) gibt das Titrationsergebnis die Menge des fermentativ gespaltenen ACh an.

Bei der Ausarbeitung der Extraktionsmethode, sowie in einigen Vorversuchen über den Einfluss der Substratkonzentration, leistete diese Bestimmungsmethode gute Dienste.

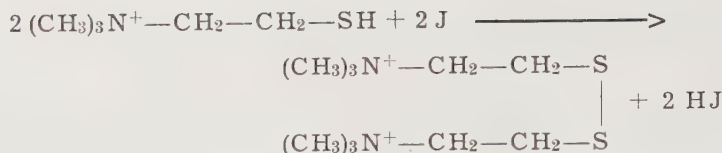
b) Azidimetrische Methode

Ein Versuch, die Mikrotitration von *Glick* (1949) unseren Verhältnissen gemäss zu modifizieren, gelang nicht.

c) Jodometrische Methode

Auf einfache und genaue Art lässt sich die ChE-Aktivität messen, wenn das ursprünglich zum histochemischen Nachweis herangezogene Azetylthiocholin (*Koelle und Friedenwald* 1949, *Koelle* 1950 a, b) nach dem Vorgehen von *Meyer* (1952) als Substrat verwendet wird. Die fermentative Spaltung verläuft analog derjenigen von ACh, jedoch wesentlich schneller (*Glick* 1939, *Koelle und Friedenwald* 1949). Das freigesetzte Thiocholin lässt sich jodometrisch erfassen, indem 1 Mol Thiocholin 1 Grammatom Jod reduziert gemäss der Formel:

* Herrn Prof. W. Leemann danke ich bestens für die leihweise Ueberlassung dieses Instrumentes.



Die Beständigkeit des Azetylthiocholins (AThChJ) ist im neutralen und sauren Gebiet recht gross, im alkalischen Gebiet dagegen gering (vollständiger Zerfall bei pH 12 in 3 Stunden). Die Eigenhydrolyse ist unter unseren Versuchsbedingungen (pH 7,4; Versuchsdauer ca. 1 Stunde) somit leicht zu berücksichtigen.

Ausführung der Messung:

Reagentien:

1. Phosphatpuffer nach *Sørensen* pH 7,4
(s. Lösung B auf S. 20)
2. Azetylthiocholinjodid* 0,01 m
3. Jodlösung:
 - a) Stammlösung von 0,1 n KJO_3
3,566 g reines KJO_3 in einem Liter Wasser,
 - b) KJ-Lösung 0,1 m
3,320 g KJ in 100 cc Wasser gelöst und mit nHCl auf 200 cc aufgefüllt. Diese KJ-Lösung muss vor der Herstellung der Jod-Titrationslösung frisch zubereitet werden, da sie nicht haltbar ist,
 - c) Jod-Titrationslösung 0,005 m:
Die zur Titration verwendete Lösung wird wie folgt hergestellt:
Lösung a) vor dem Gebrauch 1 : 10 mit Wasser verdünnen und mit Lösung b) im Verhältnis 1 : 1 mischen. Auf diese Weise wird eine 0,005 m Jodlösung erhalten,
4. 0,5%ige wässrige Stärkelösung,
5. Salzsäure 5 m.

Apparate und Geräte:

- 1 Wasserbad mit automatischer Temperaturregelung, eingerichtet zur Aufnahme von
- 8 Zentrifugengläsern (starkwandig, Inhalt 15 cc),
- 8 gebogene Glasstäbchen zum Umrühren,
- 8 Messpipetten (2 cc),
- 80 Steckkapselgläser (Inhalt ca. 3 cc),
- 1 Brett mit numerierten Bohrungen zur Aufnahme der Steckkapselgläser,
- diverse Pipetten und andere Glaswaren.

* Für die freundliche Ueberlassung von Azetylthiocholinjodid sind wir der Firma F. Hoffmann-La Roche zu Dank verpflichtet.

Technik:

In einem Zentrifugenglas verbringt man 5 cc der nach vorstehender Vorschrift hergestellten Gewebssuspension ins Wasserbad (38° C); nach 10 Minuten kommen 28,9 mg AThChJ gelöst in 5 cc Lösung B hinzu. Nach gründlichem Durchmischen werden der Lösung sofort zwei 1 cc-Proben entnommen und in zwei Steckkapselgläser gegeben, die zur Unterbindung weiterer AThChJ-Spaltung 1 Tropfen 5m HCl enthalten. Nach Zusatz von 3 Tropfen Stärkelösung werden diese Proben mit Jodlösung bis zum Farbumschlag nach blau titriert (Mikrobürette). Verwendet wird der Durchschnitt der beiden Parallelwerte. In bestimmten Zeitabständen werden auf die gleiche Art erneut zwei 1 cc-Proben entnommen und titriert. Da für die Titration von 1 cc 0,01m Thiocholinlösung 2 cc 0,005m Jodlösung erforderlich sind, entspricht 1 cc Jodlösung 1,446 mg AThChJ.

Um mit dieser Methode vertraut zu werden, wiederholte ich einige von Meyer (1952) mit menschlichem Blut durchgeführte Versuche mit Plasma und Erythrozyten von Pferd und Rind. 0,05 cc Pferdeplasma spalteten bei 38° C 28,9 mg AThChJ in 30 Minuten praktisch vollständig.

Das gleichzeitige Ansetzen von 8 Proben hat sich in den nachstehend beschriebenen Versuchen bewährt. Falls man alle Titrations unmittelbar nach Entnahme des Messgutes vornehmen will, muss eine zweite Person assistieren.*

Die zu prüfenden Inhibitoren wurden in der Regel 20 Minuten vor Versuchsbeginn zugegeben (Lösungsvolumen 1 cc); bei den Kontrollproben trat an Stelle des Inhibitors 1 cc Lösung B. Die restlichen 4 cc enthielten das AThChJ.

Der Korrekturabzug zur Berücksichtigung des Spontanzerfalles des AThChJ beläuft sich nach unseren Messungen

nach 10 Minuten auf 0,110 mg
nach 30 Minuten auf 0,270 mg
nach 60 Minuten auf 0,500 mg

Die zur Prüfung gelangten Inhibitoren beeinflussten den Spontanzerfall nicht merklich.

Eine erhebliche Korrektur wird bedingt durch das Vermögen der Extrakte, an und für sich Jod zu reduzieren. Die pro Versuchsansatz verwendeten 5 cc Extrakt reduzierten im Durchschnitt $1,00 \pm 0,05$ cc 0,005m Jodlösung. Diese Korrektur wurde in Anbetracht ihrer Grösse in jeder Versuchsreihe gesondert ermittelt und in Abzug gebracht.

Die Wirksamkeit der benützten Inhibitoren ist vorgängig den Versuchen mit Pansenwandextrakten in Ansätzen mit Pferdeplasma geprüft worden.

* Für Mitarbeit bei diesen Versuchen danke ich den Herren H.P. Stüssi und P. Scherrer.

Untersuchte Substanzen:

- a) Physostigminum salicylicum Ph. H. V,
Physostigmin- oder Eserinsalicylat,
MG 413,24; 1 T löst sich in 85 T Wasser,
die Lösungen färben sich durch Licht- und Lufteinfluss (Oxydation) all-
mählich rot.
Stammlösung $10^{-2}m = 41,3$ mg in 10 cc Wasser (heiss gelöst).
- b) Arecolinum hydrobromicum Ph. H. V,
Arekolinhydrobromid,
MG 236,04; 1 T löst sich in 0,5 T Wasser,
Stammlösung $10^{-2}m = 23,6$ mg in 10 cc Wasser.
- c) Alcaloidetum Veratri hydrochloricum (Präparat Siegfried), aus den
wasserunlöslichen reinen Alkaloidbasen durch Neutralisation mit Salz-
säure dargestellt.
MG ca. 625; wasserlöslich,
Stammlösung $10^{-2}m = 62,5$ mg in 10 cc Wasser
(die Lösung ist bräunlich und leicht getrübt)
- d) Di-isopropyl-fluorophosphat (DFP)*,
MG 184,0; farblose, visköse Flüssigkeit in wässriger Lösung unbestän-
dig (in 16 Stunden zerfällt ca. die Hälfte des DFP);
Lösungen in Oel oder Propylenglykol sind beständig.
Stammlösung $10^{-2}m = 18,4$ mg in 10 cc Propylenglykol.
Beim Arbeiten mit DFP ist grösste Vorsicht geboten (giftige Dämpfe,
perkutane Resorption). Miosis und Atembeschwerden sind als erste An-
zeichen einer DFP-Vergiftung zu betrachten. Gegenstände, die mit
DFP in Berührung kamen, habe ich 1 Stunde mit fliessendem Wasser
gespült oder 2 Tage in konzentrierter Natronlauge aufbewahrt. Mit
DFP getränkte Watte oder Papier kann unter einem Abzug verbrannt
werden.
- e) Diparcol, 2987 R. P., (Diaethylamino-2'aethyl)-N-dibenzoparathiazin**,
MG 334,5; weisses, grobes Pulver, löst sich in Wasser nicht klar, 1 T
löst sich in 30 T Propylenglykol klar,
Stammlösung $10^{-2}m = 33,45$ mg in 1 cc Propylenglykol vorgelöst und
mit Wasser auf 10 cc ergänzt.
Alle Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch hergestellt und unter
Lichtschutz aufbewahrt.

4. Resultate

Meine Versuchsergebnisse über die Beeinflussung der ChE-Aktivität
von Pansenwand-Gewebssuspensionen durch Physostigmin-, Arekolin-,
Veratrum - Alkaloide-, DFP- und Diparcollösungen abgestufter Kon-

* Herrn Prof. Wilbrandt und Herrn Dr. Meyer vom Pharmakologischen Institut der
Universität Bern danke ich für freundliche Beratung und Mithilfe bei der Herstel-
lung der DFP-Stammlösung.

** Der SOCIETE PARISIENNE D'EXPANSION CHIMIQUE «SPECIA» bin ich für die
Ueberlassung des Präparates zu Dank verpflichtet.

zentration sind in Tab. 1 und Fig. 1—6 dargestellt. Alle Messungen erfolgten nach der dargelegten jodometrischen Methode bei 38° C.

Tab. 1

Inhibitor	Molarität	x t = 10 Min.	x t = 30 Min.	x t = 60 Min.
<i>Physostigmin</i>	10 ⁻³	0,540	0,840	1,150
	10 ⁻⁴	0,350	0,890	1,590
	10 ⁻⁵	0,430	1,410	2,440
	10 ⁻⁶	0,700	2,110	4,440
	10 ⁻⁷	0,880	2,640	6,230
Kontrolle	—	2,000	5,410	10,000
<i>Arekolin</i>	10 ⁻³	1,650	3,930	6,240
	10 ⁻⁴	1,650	3,930	6,760
	10 ⁻⁵	1,720	4,450	7,230
	10 ⁻⁶	1,790	5,100	7,900
Kontrolle	—	1,790	4,910	7,830
<i>Veratrum-Alkaloide</i>	10 ⁻³	1,580	2,830	4,150
	10 ⁻⁴	1,230	3,250	5,640
	10 ⁻⁵	1,450	3,750	6,320
Kontrolle	—	1,710	4,700	7,830
<i>DFP</i>	10 ⁻³	0,760	1,060	1,850
	10 ⁻⁴	0,760	1,150	1,960
	10 ⁻⁵	0,760	1,910	3,260
	10 ⁻⁶	0,880	2,410	4,400
	10 ⁻⁷	1,150	2,690	4,850
Kontrolle	—	1,530	3,870	6,610
<i>Diparcol</i>	10 ⁻³	1,410	3,090	5,750
	10 ⁻⁴	1,410	3,390	6,280
	10 ⁻⁵	1,640	4,040	7,190
Kontrolle	—	1,752	4,510	7,860

x = bis zum Zeitpunkt t gespaltene Menge AThCHJ in mg

Fig. 1—5 stellen die durch 5 cc Pansenwand - Gewebssuspension (= 0,667 g Gewebe) umgesetzte Menge AThChJ (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse) dar. Fig. 6 gibt eine Zusammenfassung der in den Fig. 1—6 dargestellten Ergebnisse. Die Abszisse der Fig. 6 enthält den Logarithmus der Konzentration der untersuchten Substanz (—3 entspricht z. B. 10⁻³m), die Ordinate die prozentuale Hemmung der Aktivität.

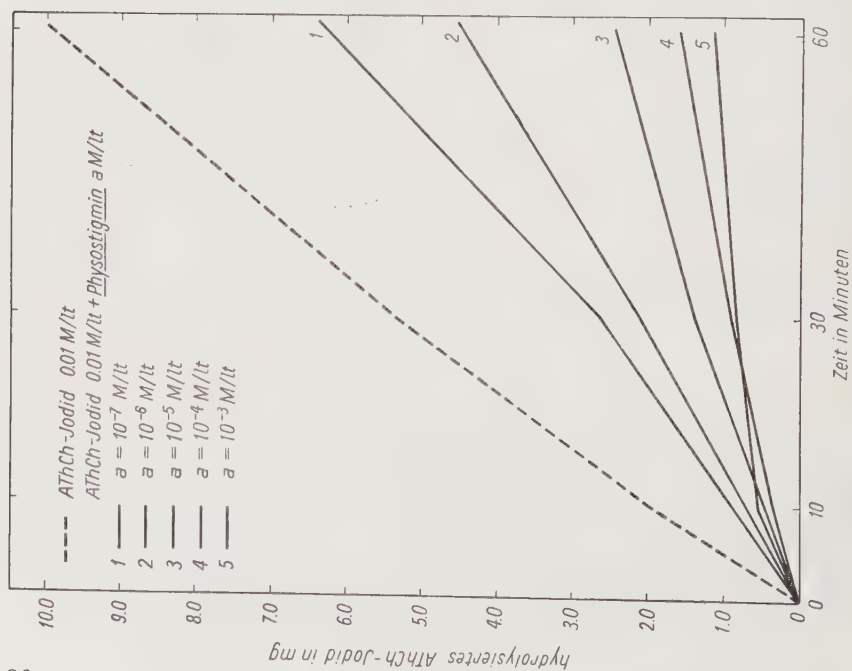


Fig. 1 Hemmung der ChE-Aktivität von Pansengewebssuspensionen durch Physostigmin.

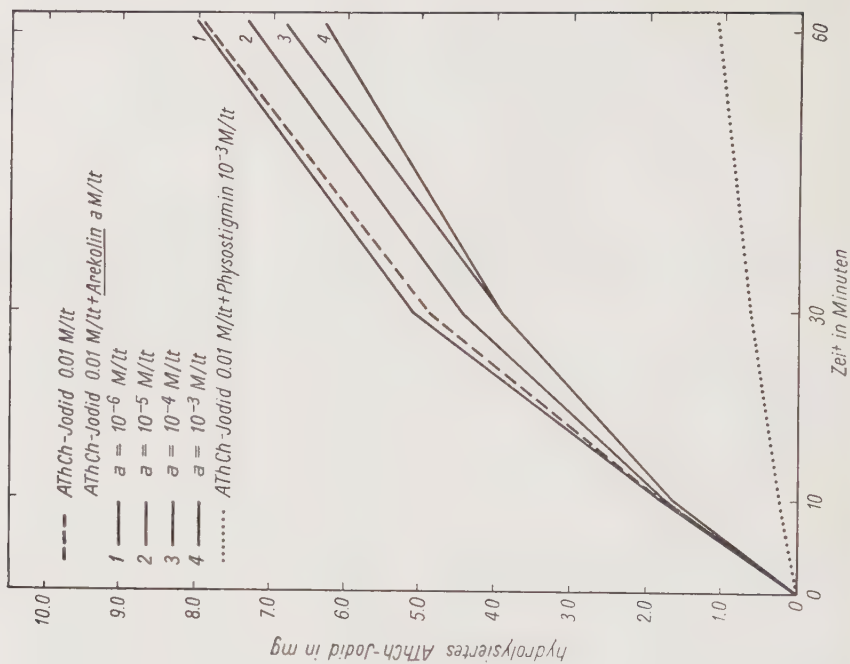


Fig. 2 Hemmung der ChE-Aktivität von Pansengewebssuspensionen durch Anekolin

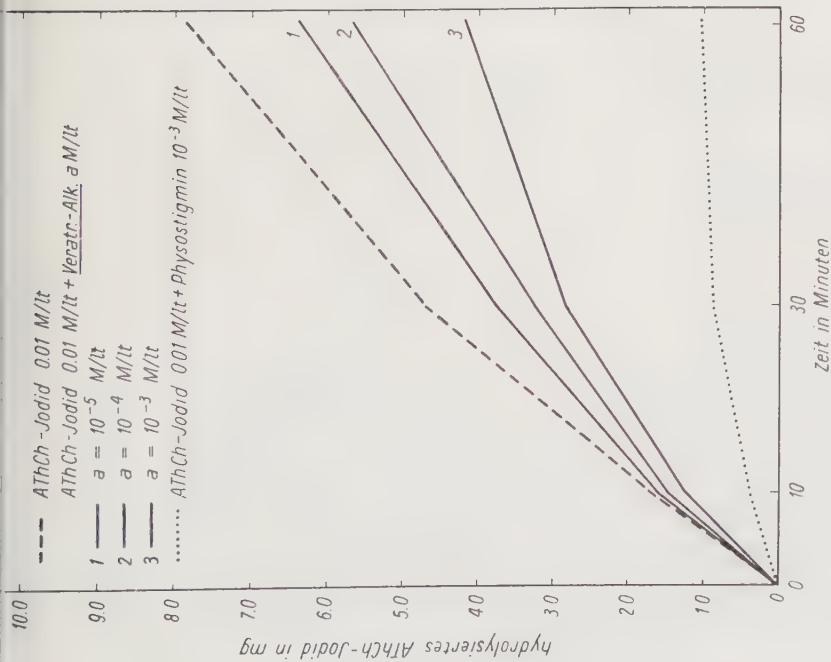


Fig 3 Hemmung der ChE-Aktivität von Pansenwand-Gewebsuspensionen durch Veratrum-Alkaloide.

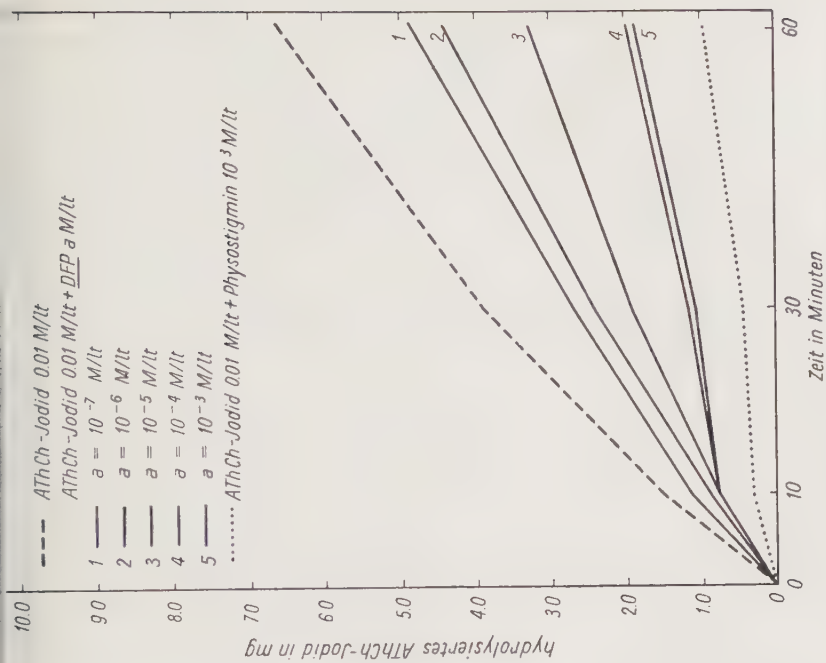


Fig 4 Hemmung der ChE-Aktivität von Pansenwand-Gewebsuspensionen durch DFP

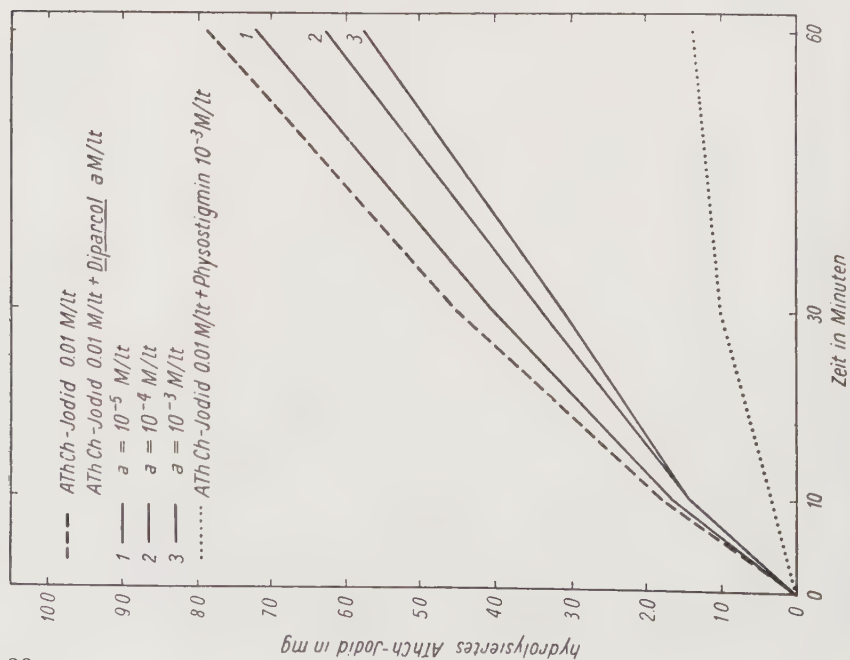


Fig 5 Hemmung der ChE-Aktivität von Pansenwand-Gewebs suspensionen durch Diparcol

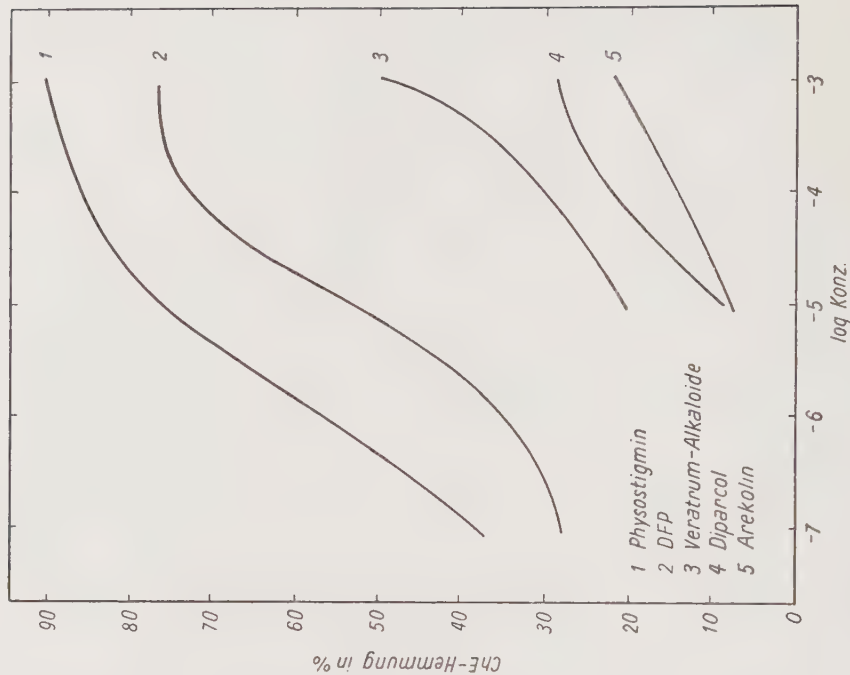


Fig 6 Prozentuale Hemmung der ChE-Aktivität von Pansenwand-Gewebs suspensionen nach 60 Minuten

Wie auf Grund der pharmakologischen Untersuchungen angenommen werden konnte, erfährt die Pansenwand-ChE durch Physostigmin und DFP die stärkste Hemmung. Der inhibitorische Einfluss des Arekolins, der Veratrum-Alkaloide und des Diparcols kommt in Konzentrationen, die beispielsweise beim Arekolin pharmakologisch sehr wirksam sind, kaum zur Geltung und könnte höchstens dann von Bedeutung sein, wenn in der Pansenwand verschiedene, ungleich hemmbare ChEn vorlägen. Die vorliegenden Experimente erlauben in dieser Richtung keine Schlüsse.

Die folgende Zusammenstellung gestattet es, die pharmakologischen Resultate mit den chemischen in grossen Zügen zu vergleichen:

Inhibitor	pharmakologische Wirkung auf Pansenwandpräparat	inhibitorische Wirkung auf Pansenwand-Ch E
<i>Physostigmin</i>	Erregung und Sensibilisierung	deutliche Hemmung
<i>Arekolin</i>	Erregung	schwache Hemmung
<i>Veratrum-Alkaloide</i>	je nach Dosierung Lähmung oder Erregung	schwache Hemmung
<i>DFP</i>	Erregung und Sensibilisierung	deutliche Hemmung
<i>Diparcol</i>	Lähmung	schwache Hemmung

5. Diskussion

Anhand der reaktionskinetischen Deutung der Experimentalergebnisse lassen sich die Sekundäreffekte, welche den Ablauf der AThCh-Spaltung durch Pansenwandextrakte und deren Hemmung durch Physostigmin, Arekolin etc. in der Regel beträchtlich stören, soweit erfassen, dass ein bereinigtes Verständnis des Problems hervorgeht.

Die enzymatische und die nichtenzymatische Hydrolyse des ACh verlaufen als Reaktion erster Ordnung (*Augustinsson 1948*), doch haben sich gewisse Einschränkungen dieser Aussage als erforderlich erwiesen (vergl. z. B. *Krayer, Goldstein und Plachte 1944*). Inwieweit im Fall der

Hydrolyse von AThCh durch Pansenwandextrakte die Reaktionskinetik der Ordnung 1 entspricht, wird durch Prüfung der Geschwindigkeitskonstante

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

ermittelt. Zur Berechnung von k_1 wurde anstelle des natürlichen einfachheitshalber der dekadische Logarithmus benützt; die Konstantenwerte sind mithin um den Faktor 0,4343 zu klein. Die im Versuchsansatz ursprünglich vorhandene Substratmenge a , sowie die zum Zeitpunkt t bereits gespaltene Substratmenge x werden in mg AThCh oder noch einfacher in cc 0,005m Jodlösung ausgedrückt.

Vorgängig den mit Pansenwandextrakten erzielten Ergebnissen seien diejenigen einer orientierenden *Versuchsreihe mit Pferdeplasma* erwähnt. Für die ungehemmte Spaltung ergab die Ermittlung von x in der 10., 20., 30. und 40. Minute als Durchschnittswert der Geschwindigkeitskonstante: $k_1 = 0,0138 \pm 0,0008 \text{ Min}^{-1}$. Die Streuung 0,0008 (des Einzelwertes) bringt Schwankungen zum Ausdruck, herrührend von Ungenauigkeiten der Messung, ungenügendem Konzentrationsausgleich, unvollständiger Temperaturkonstanz usw. Ein Gang von k_1 war nicht festzustellen. Der Zusatz von 10^{-3}m Physostigmin senkte k_1 auf $1,1 \pm 0,04\%$ des obigen Wertes. Ferner senkten k_1 10^{-3}m Zusätze von Diparcol auf $29,4 \pm 0,25\%$, von Veratrum - Alkaloiden auf $23,1 \pm 0,76\%$ und von Arekolin auf $89,3 \pm 1,05\%$ des obigen Wertes. Die gehemmte Spaltung zeigte einen Gang von k_1 lediglich im Falle des Physostigmins; der 10-Minutenwert betrug hier 0,000170, der 20-Minutenwert 0,000150, der 30-Minutenwert 0,000143 und der 40-Minutenwert 0,000140 Min^{-1} . Ein solcher zeitlicher Anstieg der Hemmung (von 98,8% auf 99,0%) ist bekannt und wird auf die relativ langsame Einstellung des Gleichgewichtes zwischen der Plasma-ChE und dem Physostigmin zurückgeführt (Kraye, Goldstein und Plachte 1944).

Die *Versuche mit Pansenwandextrakten* ergaben mit einer Ausnahme einen Gang von k_1 ; der 30-Minutenwert erwies sich um 3—15%, der 60-Minutenwert um 15—22% kleiner als der 10-Minutenwert. Auch hier dürfte die Ursache kaum in eigentlichen Abweichungen von der Reaktionsordnung 1 zu suchen sein, sondern in Nebeneffekten. Da die Extrakte zum Versuch verdünnt werden, kommt dem Herausdiffundieren von Aktivatoren (namentlich Ca^{++} -Ionen, vergl. Massart und Dufait 1939, 1940) aus den suspendierten Gewebspartikeln in diesem Zusammenhang Bedeutung zu. Andererseits ist der reaktionshemmende Einfluss der Spaltprodukte zu berücksichtigen, in Analogie zum Einfluss von Cholinzusätzen auf die Spaltungsgeschwindigkeit von ACh (Marquart und Vogg 1952). Ausschlaggebend dürften die Hydrolyse-

geschwindigkeit jedoch die Diffusionsverhältnisse in den suspendierten Gewebspartikeln beeinflussen, indem das Hindiffundieren von Substratmolekeln zu den fermentativ aktiven Stellen (den ChE-Zentren) im Inneren der Partikel, sowie das Wegdiffundieren der Spaltprodukte von diesen Stellen (ihrer Entstehung) wesentlich stärker behindert erscheint als im Falle der als β -Globulin (*Togni und Meier* 1953) molekular gelösten ChE des Blutplasmas.

Der 10-Minutenwert der Geschwindigkeitskonstante k_1 der AThCh-Spaltung durch Pansenwandextrakte liegt zwischen 0,00269 und 0,00310 Min^{-1} ; er ist somit $4^{1/2}$ —5 mal kleiner als der erwähnte k_1 -Wert 0,0138 der Spaltung durch Pferdeblutplasma. Da der Stickstoffgehalt der Pansenextraktansätze rund halb so gross ist wie jener der Plasmaansätze,* kann bei Bezug auf gleichen N-Gehalt die Aktivität der ersteren zu 40—45% der Aktivität des Plasmas geschätzt werden.

In den Versuchen über den hemmenden Einfluss von Physostigmin, Arekolin, Veratrum-Alkaloide, DFP und Diparcol auf die Hydrolyse von AThCh durch Pansenwandextrakte ist ein Gang von k_1 häufig festzustellen. Neben zeitlichen Abnahmen, wie sie bei der ungehemmten Spaltung beobachtet werden, sind hier auch Zunahmen von k_1 nachzuweisen. Anhand der verhältnismässig ausführlichen Versuchsreihe mit Physostigmin kann näher darauf eingegangen werden.

Die ungehemmte Spaltung lieferte folgende Werte von k_1 : Nach 10 Minuten 0,00306, nach 30 Minuten 0,00300, nach 60 Minuten 0,00308. Im Durchschnitt beläuft sich k_1 danach auf $0,00305 \pm 0,00004 \text{ Min}^{-1}$; ein Gang scheint nicht vorzuliegen. Die Geschwindigkeitskonstante der ungehemmten Spaltung sei mit k_1^0 bezeichnet. Zusätze von 10^{-7} bis 10^{-3} m Physostigmin senkten die Spaltungsgeschwindigkeit gemäss nachstehender Tabelle.

Tab. 2

Physo- stygmin- konzentra- tion im Ansatz m	Nach 10 Minuten		Nach 30 Minuten		Nach 60 Minuten	
	k_1 Min^{-1}	Aktivität % von k_1^0	k_1 Min^{-1}	Aktivität % von k_1^0	k_1 Min^{-1}	Aktivität % von k_1^0
10^{-7}	0,00128	42,0	0,00137	45,0	0,00174	57,1
10^{-6}	0,000990	35,5	0,00111	36,4	0,00120	39,4
10^{-5}	0,000604	19,8	0,000706	23,2	0,000624	20,4
10^{-4}	0,000492	16,2	0,000435	14,3	0,000415	13,6
10^{-3}	0,000860	28,2	0,000421	13,8	0,000291	9,6

Die die Aktivität betreffenden Angaben der Tabelle sind in Fig. 7 graphisch dargestellt; diese vermittelt bemerkenswerte Aufschlüsse

* Fr. H. Ulrich spreche ich für die Ausführung der Stickstoffbestimmungen meinen besten Dank aus.

über die Sekundäreffekte, welche im Falle der physostigmingehemmten Spaltung den zeitlichen Änderungen von k_1 zugrunde liegen.

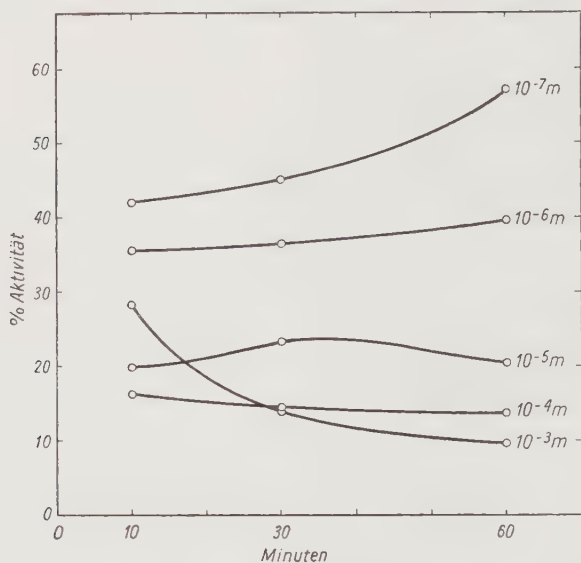


Fig 7

Bei der höchsten Physostigminkonzentration $10^{-3}m$ nimmt die Aktivität im Laufe des Versuches beträchtlich ab und zwar in der ersten halben Stunde viel stärker als in der zweiten. Nach etwa 60 Minuten scheint ein stationärer Endwert der Aktivität erreicht zu sein. Bei $10^{-4}m$ Physostigmin liegen ähnliche Verhältnisse vor, doch ist die Aktivitätsabnahme geringer. Bei der niedrigsten Physostigminkonzentration $10^{-7}m$ nimmt die Aktivität im Laufe des Versuches deutlich zu, und zwar in der ersten halben Stunde weniger als in der zweiten. Auch bei $10^{-6}m$ Physostigmin wächst die Aktivität bis zum Versuchsende. Der Uebergang von dem bei 10^{-3} und $10^{-4}m$ Physostigmin beobachteten sinkenden Aktivitätsverlauf zu dem bei 10^{-6} und $10^{-7}m$ beobachteten steigenden Verlauf tritt bei $10^{-5}m$ Physostigmin in Erscheinung. Die Aktivitätskurve steigt hier zunächst an, erreicht in etwa 30 Minuten ein flaches Maximum und sinkt wieder auf die anfängliche Höhe.

Diese Beobachtungen weisen auf zwei antagonistische Einflüsse hin, die herrühren dürften

- vom Abbau des Physostigmins durch Körpergewebe und
- vom Zeitbedarf der Gleichgewichtseinstellung zwischen Physostigmin und der Pansenwand-ChE.

Ein Abbau von Physostigmin durch Körpergewebe ist *in vivo* und *in*

vitro bekannt (Kraye, Goldstein und Plachte 1944). Da die Hemmung der ChE durch Physostigmin reversibel ist (Augustinsson 1948), erhöht dessen Abbau die Aktivität der Extrakte. Diesem bei niedriger Physostigminkonzentration dominierenden Einfluss überlagert sich mit zunehmender Physostigminkonzentration in steigendem Masse der Einfluss der Gleichgewichtseinstellung zwischen Physostigmin und ChE; indem bis zur Erreichung des stationären Gleichgewichtszustandes eine (immer langsamer) zunehmende Zahl von ChE-Zentren durch die Bindung von Physostigmin blockiert wird, sinkt die Aktivität asymptotisch auf einen Endwert. Die quantitative Trennung der beiden Effekte bereitet Schwierigkeiten; anhand der vorliegenden spärlichen Experimentaldaten lässt sie sich jedenfalls nicht erreichen. Die graphische Darstellung der Aktivität liefert bestenfalls ein approximatives Bild von deren Beziehung zur Physostigminkonzentration (Fig. 8, vergl. die Tab. 1).

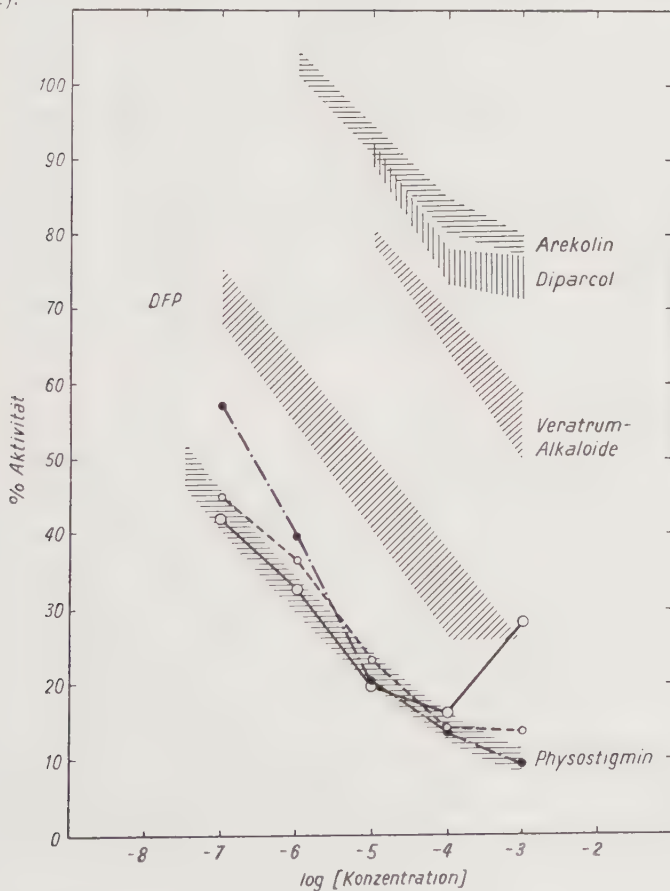


Fig. 8

Es darf nicht angenommen werden, die schraffierte Fläche der Figur bringe (als Teilstück einer Kurve der bekannten sigmoiden Form) ein Gleichgewicht zwischen Physostigmin und Pansenwand-ChE zur Darstellung, denn infolge des fortgesetzten Physostigminabbaues gelangt ein solches Gleichgewicht überhaupt nicht zur Einstellung. Die Vernachlässigung des Abbaues dürfte höchstens bei 10^{-3} m Physostigmin keine erheblichen Fehler in sich schliessen.

Im Falle der Inhibitoren Arekolin, Veratrum-Alkaloide, DFP und Diparcol liefert die Berechnung von k_1 in Anbetracht der noch weniger ausführlichen Experimentaldaten keine besonders erwähnenswerten Aufschlüsse. Da in diesen Versuchsreihen auch die ungehemmte Spaltung einen Gang von k_1^c zeigte, wird der 10- bzw. 30- bzw. 60-Minutenwert von k_1^c der Berechnung der prozentualen Aktivität zugrunde gelegt. Die auf diese Art erzielten, grob orientierenden Ergebnisse, sind in die Fig. 8 gestrichelt eingetragen.

6. Versuche zum histochemischen Nachweis der ChE-Aktivität in der Pansenwand des Rindes

Die folgenden Versuche wurden nach der Vorschrift von *Koelle und Friedenwald* (1949) durchgeführt. Da mir zu jener Zeit DFP noch nicht zur Verfügung stand, benütze ich Physostigmin zur Hemmung der Kontrollproben.

Verwendete Reagentien:

Lösung 1:

3,75 g Glykokoll,
18,0 cc nKOH,
ad 100,0 cc Aqua bidest.

Lösung 2:

0,1 molares Cuprum sulfuricum Ph. H. V.

Lösung 3:

14,5 mg Azetylthiocholinjodid,
0,75 cc Aqua bidest.,
0,25 cc Lösung 2,
zentrifugieren, überstehende Lösung verwenden.

CuThCh:

(Kupferthiocholin) wird dargestellt durch Alkalinisieren einer Lösung von AThCh in Cu-Glyzinat (0,4 cc Lösung 1, 0,2 cc Lösung 2, 8,6 cc Aqua bidest.) auf pH 12,0 und Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur. Darauf Sammeln des Niederschlages und Waschen mit destilliertem Wasser.

Inkubationslösung:

0,4 cc Lösung 1,

0,2 cc Lösung 2,

8,6 cc Aqua bidest.,

Spur CuThCh, gut verteilen, 15 Minuten Wasserbad bei 37° C, gelegentlich Schütteln; unmittelbar vor Gebrauch

0,8 cc Lösung 3 hinzufügen, filtrieren.

Lösung 1 und 2 bewahrte ich gelegentlich 2—3 Tage im Kühlschrank (+ 4° C) auf, die anderen Lösungen sind immer frisch herzustellen.

Die Ammoniumsulfidlösung wurde hergestellt durch Einleiten von H₂S (1 Stunde) in eine verdünnte Ammoniaklösung (1 T Ammoniak, 10 T Wasser).

Technik:

Die möglichst bald nach der Schlachtung hinter dem Verklebungsbezirk entnommenen Pansenwandstücke werden in eiskalter Tyrodelösung aufbewahrt, mit dem Gefriermikrotom unter Wechseln der Schnitfführung in 25 μ dicke Schnitte zerlegt und in physiologischer Kochsalzlösung mit (Kontrollschnitte) oder ohne (Testschnitte) Physostigmin 10⁻³m aufgefangen. Die Kontrollschnitte bleiben 30 Minuten in dieser Lösung. Darauf kommen je 2 Schnitte in ein Schälchen mit 10 cc Inkubationslösung während 10—60 Minuten bei Zimmertemperatur, werden 2mal vorsichtig gewaschen (mit CuThCh-gesättigtem bidest. Wasser), durch die Ammoniumsulfidlösung gezogen und in Glycerin eingebettet. Die Schnitte zeigen eine starke Neigung zum Zusammenkleben bzw. Zerfallen und erfordern eine äusserst sorgfältige Behandlung.

Bei der Betrachtung der Präparate im Mikroskop erkennt man ChE-positive Stellen an ihrer Braunfärbung durch eingelagertes CuS. Kunstprodukte und Muskelzellkerne sind mit einiger Übung leicht zu unterscheiden. Bei starker Ablendung sind die Muskelfasern auch ohne Gegenfärbung zu sehen und erlauben eine ungefähre Orientierung.

Resultate

Von den 10 untersuchten Schnittserien verschiedener Pansenteile von 5 erwachsenen Rindern zeigen nur zwei typisch gefärbte Zellen, die in Grösse und Anordnung an Ganglienzellen erinnern. Drei aufeinanderfolgende Schnitte, die 10, bzw. 30 oder 60 Minuten mit der Inkubationslösung behandelt wurden, zeigen an der gleichen Stelle zunehmend gefärbte Anhäufungen dieser Zellen.

Versuche, durch Gegenfärbung (*van Gieson*) Näheres über die Lage der gefärbten Elemente zu ermitteln, führten zu keinem eindeutigen Resultat. Eine ausführliche Wiederholung im Zusammenhang mit histologischen Untersuchungen über Struktur- und Innervation der Pansenwand scheint angezeigt.*

Es lässt sich immerhin aussagen, dass die ChE nicht gleichmässig auf die ganze Pansenwand verteilt ist, da sonst alle Schnitte gefärbte Stel-

* Frl. A. Rahn danke ich für die Mitarbeit bei den histochemischen Versuchen.

len aufweisen müssten. Vermutlich fallen die Stellen mit der grössten ChE-Aktivität mit den nervösen Elementen der Pansenwand zusammen.

Physostigmin $10^{-3}m$ (Einwirkungszeit 30 Minuten) verhindert im allgemeinen während mindestens 60 Minuten die Spaltung von AThCh in den beschriebenen Zellen.

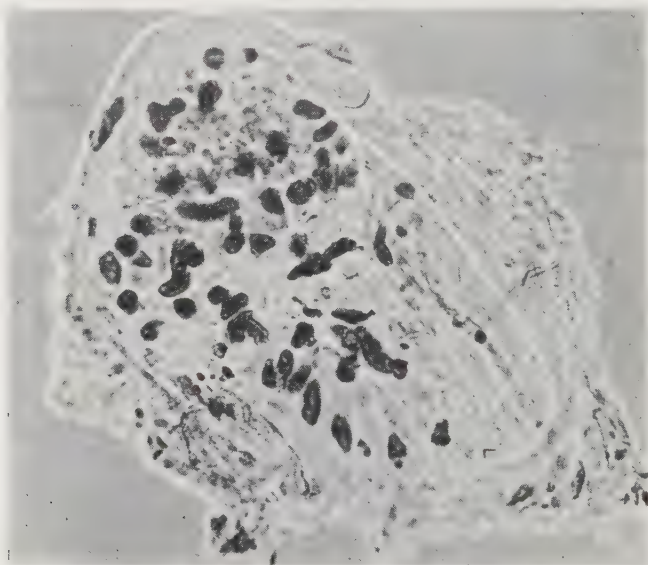


Abb. 5

Nachweis der ChE-Aktivität, Methode *Koelle und Friedenwald* (1949), Pansenwand des Rindes, Schnittführung radiär, Gefrierschnitt, Vergrößerung 325mal; dunkle Stellen zeigen ChE-Aktivität an.

IV. Zusammenfassung

1. Es wird die pharmakologische Wirkung einiger Wirkstoffe (Physostigmin, Arekolin, Veratrum-Alkaloide, Di-isopropyl-fluorophosphat (DFP) und Diparcol) auf das überlebende Pansenwandpräparat mit dem Einfluss auf die fermentative Spaltung von Azetylcholin durch Pansenwand-Gewebssuspensionen verglichen und die Frage erörtert, ob gewissen pharmakologischen Effekten eine Hemmung der Pansenwand-ChE zugrunde liegen könnte.

2. Die kymographisch festgehaltenen Kontraktionsänderungen des Pansenwandpräparates lassen eine erregende Wirkung von Physostigmin und DFP erkennen; sie geht in vielen Fällen mit einer Sensibilisierung des Pansenwandpräparates für Azetylcholin in an sich unterschwelligen Dosen einher. Arekolin wirkt am Pansenwandpräparat stark erregend, nie aber sensibilisierend. Wie bei den Veratrum-Alkaloiden und beim Diparcol lassen sich pharmakologisch keine Anhaltspunkte für eine Hemmung der Pansenwand-ChE finden.

3. Versuche über den Verlauf der fermentativen Azetylthiocholin-spaltung durch Pansenwand-Gewebssuspensionen bei Zusatz der genannten Wirkstoffe erlauben eine approximative Beurteilung von deren inhibitorischen Eigenschaften. Eine namhafte Inhibition der Pansenwand-ChE erfolgt lediglich durch Physostigmin und DFP.

4. Eine Gegenüberstellung der pharmakologischen und der chemischen Resultate berechtigt zur Annahme, dass die Wirkung von Physostigmin und DFP am überlebenden Pansenwandpräparat grösstenteils auf einer Hemmung der Pansenwand-ChE beruht.

5. Histochemisch konnten in einzelnen Schnitten durch die Pansenwandmuskulatur Zellanhäufungen mit ChE-Aktivität nachgewiesen werden.

V. Literatur

- Abderhalden, E. und Paffrath, H. (1926), *Fermentforschung*, 8, 299
- Abdon, N.-O. und Uvnäs, B. (1937), *Skand. Arch. Physiol.*, 76, 1
- Alexander, W. F., Dillon, J. B. und Jordan, C. N. (1938), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 38, 566
- Alles, G. A. und Hawes, R. C. (1940), *J. biol. Chem.*, 133, 375
- Ammon, R. (1933), *Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 233, 486
- Anfinsen, C. B., Lowry, O. H. und Hastings, A. B. (1942), *J. cell. comp. Physiol.*, 20, 231 (zit. Augustinsson 1948)
- Augustinsson, K.-B. (1944), *Ark. Kemi Miner. Geol.*, 18 A, Nr. 24
- Augustinsson, K.-B. (1948), *Acta physiol. Skand.*, 15, Suppl. 52
- Barbour, H. G. und Dickerson, V. C. (1939), *J. Pharmacol.*, 65, 281
- Beaujard, P. (1944), *Recherches sur les alcaloïdes inhibiteurs de la cholin-estérase (applications toxicologiques)* Toulouse (Thèse)
- Bergel, F. (1951), *J. Pharmacy and Pharmacol.*, 3, 385
- Bernheim, F. und Bernheim, M. L. C. (1936), *J. Pharmacol.*, 57, 427
- Boell, E. J. (1945 a), *J. cell. comp. Physiol.*, 25, 75 (zit. Augustinsson 1948)
- Boell, E. J. (1945 b), *J. exp. Zool.*, 100, 331
- Boell, E. J. und Shen, S.-C. (1944), *J. exp. Zool.*, 97, 21
- Bovet, D. und Bovet-Nitti, F. (1948), *Structure et activité pharmacodynamique des médicaments du système nerveux végétatif*, Basel, Editions S. Karger
- Cushny, A. R. (1941), *Pharmacology and Therapeutics*, Churchill Ltd., London
- Dale, H. H. (1914), *J. Pharmacol.*, 6, 147
- Delaunois, A. L. und Casier, H. (1946), *Experientia*, 2, 67, 147
- Easson, L. H. und Stedman, E. (1936), *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, 121, 142 (zit. Augustinsson 1948)
- Engelhart E. und Loewi, O. (1930), *Arch. exp. Path. Pharm.*, 150, 1
- Faber, M. (1943), *Acta med. Skand.*, 114, 72, 475
- Feldberg, W. (1943), *J. Physiol.*, 101, 432
- Forster, . (1933), *Med. Klin.*, 29, 993 (zit. Augustinsson 1948)
- Fühner, H. (1918), *Arch. exp. Path. Pharm.*, 82, 51
- Glick, D. (1937), *Biochem. J.*, 31, 521
- Glick, D. (1938), *J. gen. Physiol.*, 21, 289
- Glick, D. (1939), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 40, 140
- Glick, D. (1949), *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, Interscience Publishers, NY, London
- Glick, D., Glaubach, S. und Moore, D. H. (1942), *J. biol. Chem.*, 144, 525
- Gomori, G. (1948), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 68, 354
- Gordon, J. J. (1948), *Nature, London*, 162, 146
- Graf, H. (1952 a), *Tierärztl. Umschau*, 7, 301
- Graf, H. (1952 b), *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 94, 316
- Henri, V. (1903), *Lois générales de l'action des diastases*, Paris (zit. Michaelis und Menten 1913)
- Kahane, E. und Levy, J. (1936), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 202, 781 (zit. Augustinsson 1948)
- Kahane, E. und Levy, J. (1937), *Arch. int. Pharmacodyn.*, 57, 467

- Keilin, D. und Wang, Y. L. (1947), *Biochem. J.*, **41**, 491
- Koelle, G. B. (1950 a), *J. Pharmacol.*, **98**, 18
- Koelle, G. B. (1950 b), *J. Pharmacol.*, **100**, 158
- Koelle, G. B. und Friedenwald, J. S. (1949), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **70**, 617
- Koelle, G. B. und Gilman, A. (1949), *Pharmacol. Rev.*, **1**, 166
- Koelle, G. B., Koelle, E. S. und Friedenwald, J. S. (1950),
J. Pharmacol., **100**, 180
- Krause, D. (1952), *Deutsche tierärztl. Wschr.*, **59**, 193
- Krayer, O., Goldstein, A. und Plachte, F. L. (1944), *J. Pharmacol.*, **80**, 8
- Kroll, F.-W. (1934), *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, **102**, 284
- Kwiatkowski, H. (1936), *Fermentforschung*, **15**, 138
- Lienert, E. (1950), *Wiener tierärztl. Mschr.*, **37**, 677
- Loewi, O. und Navratil, E. (1926), *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **214**, 678, 689
- Manning, G. W., Lang, J. und Hall, G. E. (1937), *J. Pharmacol.*, **61**, 350
- Marquart, P. und Vogg, G. (1952), *Biochem. Z.*, **323**, 309
- Massart, L. und Dufait, R. (1939), *Enzymologia*, **6**, 282; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 1039 (zit. Augustinsson 1948)
- Massart, L. und Dufait, R. (1940), *Nature, London*, **145**, 822
- Mazur, A. und Bodansky, O. (1946), *J. biol. Chem.*, **163**, 261;
Science, **102**, 517 (1945)
- Mc Combie, H. und Saunders, B. C. (1946), *Nature, London*, **157**, 287, 776
- Mendel, B. und Rudney, H. (1945), *Science*, **102**, 616
- Meyer, A. (1952), unveröffentlicht
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913), *Biochem. Z.*, **49**, 333
- Michel, H. O. (1949), *J. Labor. clin. Med. (Am.)*, **34**, 1564
(zit. Strehler und Meyer 1952)
- Minz, B. (1932), *Arch. exp. Path. Pharm.*, **168**, 292
- Muralt, A. v. (1937), *Proc. Roy. Soc. London*, **123**, 399 (zit. Bovet, Bovet-Nitti 1948)
- Muralt, A. v. und Schulthess, . (1944), *Helv. Physiol. Acta*, **2**, 435
- Myers, D. K. (1950), *Arch. Biochem.*, **27**, 341
- Myers, D. K. (1952), *Biochem. J.*, **52**, 46
- Nachmansohn, D. (1940), *Nature, London*, **145**, 513
- Nachmansohn, D. und Lederer, E. (1939), *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 321
- Nachmansohn, D., Rothenberg, M. A. und Feld, E. A. (1948),
J. biol. Chem., **174**, 247
- Nachmansohn, D. und Schneemann, H. (1945), *J. biol. Chem.*, **159**, 239
- Plattner, F. (1926), *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **214**, 112
- Plattner, F. und Mitarb. (1928), *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **218**, 488, 506;
219, 181, 678, 686; **220**, 180, 606
- Plattner, F. und Hintner, H. (1930), *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **225**, 19
- Potter, V. R. und Elvehjem, A. R. (1936), *J. biol. Chem.*, **114**, 495
- Quastel, J. H., Tennenbaum, M. und Wheatley, A. M. H. (1936),
Biochem. J., **30**, 1668
- Rave, H.-H. (1952),* *Vet. Med. Diss.*, Hannover
- Ravin, H. H., Tsou, K.-C. und Seligman, A. M. (1951), *J. biol. Chem.*, **191**, 843
- Renshaw, R. R., Dreisbach, P. F., Ziff, M. und Green, D. (1938),
J. Am. Chem. Soc., **60**, 1765

* Pharmakologische Untersuchungen an der glatten Muskulatur des Verdauungskanal vom Rind.

- Riechert, W. und Schnarrenberger, C. (1942), Arch. exp. Path. Pharm., 200, 225
- Rothenberg, M. A. und Nachmansohn, D. (1947), J. biol. Chem., 168, 223
- Sanz, M. C. (1943), Pflügers Arch. ges. Physiol., 247, 317
- Sanz, M. C. (1944), Helv. physiol. pharm. Acta, 2, C 29;
ferner Experientia, 2, 111 (1946)
- Sawyer, C. H. (1943), J. exp. Zool., 92, 1
- Schäfer, H. (1952), Der Anaesthesist, 1, 1
- Schümmelfeder, N. (1947), Arch. exp. Path. Pharm., 204, 454
- Scoz, G. und Cattaneo, C. (1937), Enzymologia, 4, 157 (zit. Augustinsson 1948)
- Sollmann, T. (1945), A Manual of Pharmacology and its applications to Therapeutics and Toxicology, Philadelphia and London, W. B. Saunders Company
- Stedman, E., Stedman, E. und Easson, L. H. (1932), Biochem. J., 26, 2056
- Strehler, E. und Meyer, H. (1952), Helv. med. Acta, 19, 555
- Stücklin, K. (1951),* Vet. Med. Diss., Zürich
- Stüttgen, S. (1947), Klin. Wschr., 24/25, 758
- Todrick, A. (1952), Biochem. J., 52, xxviii
- Togni, G. P. und Meier, O. (1953), Experientia, 9, 106
- Vahlquist, B. (1935), Skand. Arch. Physiol., 72, 133
- Werle, E. und Uebelmann, H. (1938), Arch. exp. Path. Pharm., 189, 421
- Whittaker, V. P. (1951), Physiol. Rev., 31, 312
- Whitteridge, D. (1948), J. Neurol., Neurosurg. and Psychiat., II, 134
(zit. Whittaker 1951)
- Wieczorek, A. (1937), Die Cholin-Esterase des Blutes unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen, Freiburg i. Br. (zit. Augustinsson 1948)
- Zachowski, J. und Ammon, R. (1943), Klin. Wschr., 22, 702

* Zur Pharmakologie der Rhizoma Veratri an Wand und Inhalt des Pansens beim Rinde.

Meinem verehrten Chef, Herrn Prof. Dr. Hans Graf, spreche ich für die Ueberlassung des Themas und für das rege Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegenbrachte, meinen besten Dank aus. Herrn Prof. Dr. Felix Almasy bin ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung des chemischen Teiles und insbesondere bei der Auswertung der Resultate zu grossem Dank verpflichtet.

Ebenso möchte ich den Herren Prof. Dr. Wilbrandt und Dr. Meyer, die mir in zuvorkommender Weise die jodometrische Titrationsmethode zur Verfügung gestellt haben, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Der Direktion des Städtischen Schlachthofes danke ich für das Entgegenkommen bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials.

Curriculum vitae

Geboren am 24. Juli 1927 in Mailand, aufgewachsen in Genua. Besuch der Primar-, Sekundar- und Kantonsschule in Schaffhausen. Maturitätsprüfung im Herbst 1946. Tierärztliches Studium und Fachprüfung in Zürich (Sommer 1951). Vom 1. November 1951 bis 31. Juli 1953 Assistent am Veterinär - Pharmakologischen Institut der Universität Zürich, zur Zeit Assistent an der Kleintierklinik des kantonalen Tierspitals Zürich.